

Generierung schaltbarer Antikörperfragmente

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Sarah-Jane Kellmann
aus Berlin-Neukölln

1. Referent:	Professor Dr. Stefan Dübel
2. Referent:	apl. Professor Dr. Michael Hust
3. Referent:	Professor Dr. Roland Kontermann
eingereicht am:	06.02.2017
mündliche Prüfung (Disputation) am:	10.05.2017
Druckjahr:	2017

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikation:

Kellmann, S., Dübel, S., Thie, H. (2017). A strategy to identify linker-based modules for the allosteric regulation of antibody-antigen binding affinities of different scFvs. *mAbs* 9 (3), 404-418.

Patent:

Kellmann, S., Dübel, S., Thie, H. (2016). Composition and method for affecting the binding of antigen-binding polypeptides to antigens (EP16181971.9).

Inhaltsverzeichnis

VORVERÖFFENTLICHUNGEN DER DISSERTATION.....	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IX
TABELLENVERZEICHNIS.....	XI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XIII
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1 Abstract.....	2
2 EINLEITUNG	3
2.1 Antikörper	3
2.1.1 Antikörperfragmente	4
2.2 Affinität.....	6
2.3 Anwendungen für Antikörperfragmente.....	7
2.3.1 Antikörper und Antikörperfragmente mit modulierbarer Affinität	8
2.4 Calmodulin	9
2.4.1 Nutzung der Calmodulin/Calmodulin-Bindeprotein-Interaktion als reversiblen Affinitäts- und Immobilisierungstag	12
2.4.2 Nutzung von Calmodulin als <i>Input</i> -Domäne eines schaltbaren Systems	13
2.5 Zirkuläre Permutation	14
2.5.1 Methoden zur Generierung von Permutanten.....	15
2.5.2 Generierung von Permutanten zur Verbesserung von Proteineigenschaften	16
2.5.3 Erzeugung schaltbarer Systeme mittels zirkulärer Permutation.....	17
2.6 Ziele der Arbeit	18
3 MATERIAL	19
3.1 Chemikalien, Materialien und Software.....	19
3.1.1 Chemikalien.....	19
3.1.2 Kits	19
3.1.3 Sonstige Verbrauchsmaterialien.....	19
3.1.4 Geräte	20
3.1.5 Software, Online-Tools, Datenbanken	22
3.2 Puffer und Lösungen	23

3.3 Nährmedien zur Anzucht von Mikroorganismen	24
3.4 Mikroorganismen, Plasmide und Oligonukleotide	25
3.4.1 Mikroorganismen	25
3.4.2 Plasmide	25
3.4.3 Oligonukleotide zur Sequenzierung und Kolonie-PCR	25
3.5 Enzyme, Antikörper, Reagenzien zur durchflusszytometrischen Analyse und Peptide ..	26
3.5.1 Enzyme	26
3.5.2 Antikörper und Reagenzien zur durchflusszytometrischen Analyse.....	26
3.5.3 Peptide	27
4 METHODEN	31
4.1 Molekularbiologische Methoden	31
4.1.1 Methoden zur DNA-Isolierung.....	31
4.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	31
4.1.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA	31
4.1.2 Amplifikation von DNA	31
4.1.2.1 Erzeugung permutierter Calmodulin-Varianten.....	31
4.1.2.2 Kolonie-PCR	32
4.1.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	33
4.1.4 Reinigung von DNA	33
4.1.5 Methoden zur DNA-Modifikation und Klonierung	33
4.1.5.1 Restriktion von DNA mithilfe von Restriktionsendonukleasen.....	33
4.1.5.2 Dephosphorylierung linearer Plasmid-DNA	33
4.1.5.3 Ligation von DNA-Fragmenten	34
4.1.5.4 Sequenzierung von PCR-Fragmenten und Plasmid-DNA	35
4.2 Mikrobiologische Methoden	35
4.2.1 Methoden zur Kultivierung verschiedener <i>E. coli</i> -Stämme	35
4.2.2 Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	35
4.2.3 Erzeugung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	35
4.2.4 Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (Hanahan, 1983).....	36
4.2.5 Produktion von scFv-Fragmenten im MTP-Maßstab	36
4.2.6 Produktion von scFv-Fragmenten im Schüttelkolbenmaßstab	36
4.3 Biochemische Methoden	37
4.3.1 Isolierung von scFv-Fragmenten aus dem Periplasma von <i>E. coli</i>	37
4.3.1.1 Periplasmapräparation von <i>E. coli</i> – MTP-Maßstab	37
4.3.1.2 Periplasmapräparation von <i>E. coli</i> – Schüttelkolbenmaßstab	37
4.3.2 Aufreinigung von scFv-Fragmenten über Affinitätschromatographie	37
4.3.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen über SDS-PAGE	38
4.3.4 Färbung und Trocknung von Proteingelen	38
4.3.5 Western Blot	38
4.3.6 Methoden zur quantitativen Proteinbestimmung.....	39
4.3.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels SDS-PAGE.....	39
4.3.6.2 Bradford-Assay	39
4.3.7 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Engvall & Perlmann, 1971)	39
4.3.7.1 Kompetitiver ELISA	39
4.3.7.2 Release-ELISA	40
4.3.7.3 Titrations-ELISA.....	40
4.4 Zellbiologische Methoden.....	41
4.4.1 Durchflusszytometrische Analyse von scFv-Fragmenten	41

4.4.1.1 Färbung von PBMC mit kruden scFv-CaM-Fusionen	41
4.4.1.2 Färbung von PBMC mit gereinigten scFv-CaM-Fusionen	41
4.4.1.3 Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) mittels Titration	42
4.5 Biophysikalische Methoden	43
4.5.1 Intaktmassebestimmung von scFv-Fragmenten mittels LC/MS	43
4.5.2 Präparative Größenausschlusschromatographie (präparative SEC)	43
4.5.3 Analytische Größenausschlusschromatographie (analytische SEC)	43
4.6 Statistik	44
4.6.1 Statistische Analysen mittels GraphPad Prism 7	44
5 ERGEBNISSE	45
5.1 Erzeugung einer permutierten Calmodulin-Linker-Bibliothek im α-Lysozym scFv D1.3	45
5.2 Identifizierung schaltbarer scFv D1.3-Calmodulin-Varianten mittels kompetitivem ELISA	48
5.3 Evaluierung der M13-Peptid-abhängigen Affinitätsänderung verschiedener scFv D1.3-Calmodulin-Fusionen	51
5.3.1 Sequenzverifizierung, Reinigung und Intaktmassebestimmung ausgewählter scFv D1.3-Calmodulin-Varianten	51
5.3.2 Evaluierung der peptidabhängigen Änderung der Bindung gebundener scFv D1.3-Calmodulin-Varianten mittels <i>Release</i> -ELISA	52
5.3.3 Verifizierung der spezifischen Interaktion zwischen Calmodulin-Linker und M13-Peptid mittels Titrations-ELISA	54
5.4 Übertragung des Calmodulin-Linker basierten Systems auf weitere scFv-Spezifitäten..	56
5.4.1 Klonierung ausgewählter Calmodulin-Linker in diverse scFv-Spezifitäten	56
5.4.2 Identifizierung schaltbarer scFv-Calmodulin-Varianten mittels kompetitiver PBMC-Färbung.....	56
5.4.3 Reinigung und Intaktmassebestimmung der α CD14, α Biotin und α CD4 scFv-Calmodulin-Varianten	58
5.4.4 Verifizierung des affinitätsmodulierenden Effekts des M13-Peptids auf α CD14, α Biotin und α CD4 scFv-Calmodulin-Varianten	61
5.5 Identifizierung weiterer affinitätsmodulierender Calmodulin-Bindepeptide.....	63
5.6 Evaluierung des Schaltmechanismus der αCD14 scFv-Calmodulin M-perm-2-Variante unter Einfluss von M13-Peptid	69
5.6.1 Präparative Größenausschlusschromatographie (SEC)	69
5.6.2 Kompetitive Färbung von PBMC mit SEC-gereinigten α CD14 scFv-Varianten	70
5.6.3 Analytische Größenausschlusschromatographie (SEC)	71
5.7 Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_D) mittels Titration der Bindung im Gleichgewicht	72
6 DISKUSSION	75
6.1 Generierung eines Calmodulin/Calmodulin-Bindepeptid-basierten schaltbaren scFv-Systems.....	75

6.2 Vorteile des Calmodulin/Calmodulin-Bindepeptid-basierten Systems	79
6.3 Zukünftige Ansätze zur weiteren Verbesserung des Calmodulin/Calmodulin-Bindepeptid-basierten Systems.....	82
6.4 Fazit und Ausblick	84
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	87
8 ANHANG.....	99
8.1 Vektorkarten	99
8.2 Sequenz des Calmodulin (synthetisches Gen mit GGSG-Linker).....	99
8.2.1 Aminosäuresequenz (humanes Calmodulin, nach Genbank ID: ADD45181.1).....	99
8.2.2 Nukleotidsequenz (optimiert zur Expression in <i>E. coli</i>)	99
8.3 Aminosäuresequenzen ausgewählter permutierter Calmodulin-Varianten	99
8.3.1 N-perm-1 (3/A).....	99
8.3.2 N-perm-2 (4/D).....	99
8.3.3 M-perm-1 (78/M)	100
8.3.4 M-perm-2 (83/S).....	100
8.3.5 C-perm-1 (150/K).....	100
8.3.6 C-perm-2 (149/A).....	100
8.4 Oligonukleotide zur Erzeugung permutierter Calmodulin-Varianten.....	100
DANKSAGUNG.....	103
LEBENS LAUF	105
WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN	106

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Aufbau von Volllängenantikörpern und Antikörperfragmenten.....	4
Abb. 2.2: Überblick zur stimulusabhängigen Konformationsänderung in Calmodulin	10
Abb. 2.3: Zirkuläre Permutation – allgemeiner Überblick	15
Abb. 2.4: Methoden zur Generierung genetischer Permutationen.....	16
Abb. 2.5: Hypothetischer Mechanismus eines Calmodulin/M13-Peptid-basierten schaltbaren scFv-Systems	18
Abb. 5.1: Erzeugung permutierter Calmodulin-Varianten mittels PCR – Strategieüberblick.....	46
Abb. 5.2: Erzeugung permutierter Calmodulin-Varianten mittels PCR – Zirkularisierung, Permutagenese-PCR und Kolonie-PCR.....	47
Abb. 5.3: Kompetitiver ELISA zur Identifizierung schaltbarer scFv D1.3-Calmodulin-Varianten	49
Abb. 5.4: Ligationsstellen permutierter CaM-Varianten mit starkem bindungsmodulierendem Effekt in scFv D1.3	50
Abb. 5.5: Qualitätskontrolle gereinigter scFv D1.3-Varianten mittels SDS-PAGE.....	52
Abb. 5.6: <i>Release</i> -ELISA – Evaluierung peptidabhängiger Affinitätsänderung gebundener scFv D1.3-Calmodulin-Varianten	53
Abb. 5.7: Titrations-ELISA – Verifizierung spezifischer Interaktion zwischen Calmodulin-Linker und M13-Peptid	55
Abb. 5.8: Konstruktüberblick der einzelnen scFv-Spezifitäten	56
Abb. 5.9: <i>Gating</i> -Strategie.....	57
Abb. 5.10: Identifizierung schaltbarer scFv-Calmodulin-Varianten mittels kompetitiver PBMC-Färbung	58
Abb. 5.11: Qualitätskontrolle gereinigter α CD14 und α CD4 scFv-Varianten mittels SDS-PAGE	59
Abb. 5.12: Intaktmassebestimmung der α CD4 scFv-CaM M-perm-2-Variante	60
Abb. 5.13: Verifizierung des affinitätsmodulierenden Effekts des M13-Peptids auf α CD14, α Biotin und α CD4 scFv-Calmodulin-Varianten.....	62
Abb. 5.14: Überblick über das Ausmaß der peptidabhängigen Schaltbarkeit verschiedener α CD14, α Biotin und α CD4 scFv-Calmodulin-Varianten.....	63
Abb. 5.15: Identifizierung weiterer affinitätsmodulierender Calmodulin-Bindepeptide – Überblick	64
Abb. 5.16a: Identifizierung weiterer affinitätsmodulierender Calmodulin-Bindepeptide – vielversprechendste Varianten.....	66

Abb. 5.16b/c: Identifizierung weiterer affinitätsmodulierender Calmodulin-Bindepeptide – vielversprechendste Varianten	67
Abb. 5.17: Identifizierung weiterer affinitätsmodulierender Calmodulin-Bindepeptide – vielversprechendste Varianten (Statistik)	68
Abb. 5.18: Präparative Größenausschlusschromatographie (SEC) von α CD14 scFv-CaM M-perm-2 und α CD14 scFv-WT	70
Abb. 5.19: Kompetitive Färbung von PBMC mit SEC-gereinigten α CD14 scFv-CaM M-perm-2 und α CD14 scFv-WT Monomeren	71
Abb. 5.20: Analytische Größenausschlusschromatographie (SEC) von α CD14 scFv-CaM M-perm-2 und α CD14 scFv-WT	72
Abb. 5.21: Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_D) von α CD14 scFv-CaM M-perm-2 und α CD14 scFv-WT mittels Titration	73

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Übersicht von Aminosäuresequenzen verschiedener Calmodulin-Bindepeptide (modifiziert nach Crivici & Ikura, 1995; Hultschig <i>et al.</i> , 2004)	11
Tab. 4.1: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes zur Erzeugung permutierter Calmodulin- Varianten.....	32
Tab. 4.2: PCR-Programm zur Erzeugung permutierter Calmodulin-Varianten	32
Tab. 4.3: Zusammensetzung eines Kolonie-PCR-Ansatzes	32
Tab. 4.4: Programm für Kolonie-PCR.....	32
Tab. 4.5: Typischer präparativer und analytischer Restriktionsverdau	33
Tab. 4.6: Ansatz zur Dephosphorylierung linearer Plasmid-DNA	34
Tab. 4.7: Ligationsansatz	34
Tab. 4.8: Zirkularisierungsansatz.....	35
Tab. 5.1: Vielversprechende scFv D1.3-Calmodulin-Fusionen.....	51
Tab. 5.2: Intaktmassebestimmung gereinigter scFv D1.3-Varianten	52
Tab. 5.3: Intaktmassebestimmung gereinigter α CD14 und α CD4 scFv-Varianten	60
Tab. 5.4: Verwendete Titer für kompetitive PBMC-Färbungen mit gereinigten scFvs	61
Tab. 5.5: Vielversprechendste Calmodulin-Bindepeptide mit affinitätsmodulierenden Eigenschaften.....	68

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
Abb.	Abbildung
A	Ampicillin
AG	Antigen
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	zirka
Ca^{2+} -ATPase	Plasmamembran-Calcium-ATPase
CaM	Calmodulin
CaMKI/CaMKII	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase type I/II</i>
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i>
CBP	Calmodulin-Bindepeptid/Bindeprotein
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDR	<i>complementarity determining region</i>
C_H	konstante Domäne der schweren Kette
C_L	konstante Domäne der leichten Kette
cNOS	<i>cerebellar nitric oxide synthase</i>
Da	Dalton
d.h.	das heißt
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	<i>endothelial nitric oxide synthase</i>
<i>et al.</i>	und andere
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
Fc	<i>fragment crystallizable</i>

FcR	Fc-Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
Fv	<i>fragment variable</i>
G	Glucose
g	Gramm
<i>g</i>	Schleuderziffer
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GOI	<i>gene of interest</i>
°C	Temperatur in Grad Celsius
h	Stunde
H _C	schwere Kette (<i>heavy chain</i>)
His	Histidin
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Ig (A, D, E, G, M)	Immunglobulin (A, D, E, G, M)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kbp	Kilobasenpaare
K	Kanamycin
k _a /k _{on}	Assoziationsratenkonstante
k _d /k _{off}	Dissoziationsratenkonstante
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
L	Liter
L _C	leichte Kette (<i>light chain</i>)
LC/MS	<i>liquid chromatography/mass spectrometry</i>
Lsg.	Lösung
M	Molar
mA	Milliampere
MARCKS	<i>myristoylated alanine-rich C-kinase substrate</i>
mg	Milligramm
min	Minute
mM	Millimolar
MQ	MACSQuant®
MTP	Mikrotiterplatte
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat

NS6	Nickel Sepharose 6
OD	Optische Dichte
Orail	<i>calcium release-activated calcium channel protein 1</i>
p75 ^{NTR}	<i>p75 neutrophin receptor</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDE	<i>cyclic nucleotide phosphodiesterase</i>
PE	Phycoerythrin
PFK	Phosphofructokinase
PI	Propidiumiodid
pI	isoelektrischer Punkt
PP	Polypropylen
PPP	Periplasmapräparation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rH ₂ O	Reinstwasser
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
scFv	<i>single-chain fragment variable</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
skMLCK	<i>skeletal muscle myosin light chain kinase</i>
smMLCK	<i>smooth muscle myosin light chain kinase</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>
SV	Säulenvolumen
T _A	spezifische Primerannealingtemperatur
Tab.	Tabelle
TAE	<i>Tris/acetic acid/EDTA</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TE	Tris EDTA
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
U	Unit
u.a.	unter anderen/unter anderem
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar

µm	Mikrometer
üN	über Nacht
V	Volt
Var	Variante
VDCC	<i>voltage-dependent calcium channel</i>
vgl.	vergleiche
V _H	variable Domäne der schweren Kette
V _L	variable Domäne der leichten Kette
v/v	<i>volume to volume</i>
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight to volume</i>
YP	<i>yeast extract - pepton</i>
z. B.	zum Beispiel

1 Zusammenfassung

ScFv (*single-chain fragment variable*) Antikörperfragmente werden in einer Vielzahl von Anwendungen genutzt, wie z. B. in der Forschung, in der Diagnostik und sogar für therapeutische Zwecke. Für die meisten Anwendungen, wie z. B. der Reinigung von Proteinen, ist dabei die außergewöhnliche Spezifität, Selektivität und Affinität der Antikörper essentiell. Allerdings sind hierbei bedingt durch die oft sehr hohen Affinitäten der Antikörper harsche Elutionsbedingungen notwendig, welche typischerweise die Faltung, Integrität und Viabilität des eluierten Materials beeinträchtigen. Antikörper mit hoher Spezifität und zugleich modulierbarer Affinität wären somit von großem Vorteil. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Konformationsänderungen in der Linkerregion zwischen V_H und V_L eines scFv-Fragments die Konformation der Antigenbindestelle beeinflussen können, woraus eine Modulation der Affinität resultiert.

In dieser Arbeit wurden alle möglichen Orientierungen eines zirkulär permutierten Calmodulin-Moleküls als Linkerregion in den Lysozym-bindenden scFv D1.3 inseriert. Unter Einfluss von Calcium und Calmodulin-Bindepartnern erfährt Calmodulin (CaM) starke Konformationsänderungen. Vorinkubation mit dem konformationsändernden M13-Peptid, unter Einfluss von Calcium, führte zu signifikanten Änderungen in der Antigenbindung zahlreicher scFv-Calmodulin-Fusionen. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Dissoziation des bereits etablierten Antikörper-Antigen-Komplexes durch Zugabe von M13-Peptid und Calcium möglich ist. Im Anschluss erfolgte die Klonierung der vielversprechendsten CaM-Linkervarianten in weitere scFv-Spezifitäten, da evaluiert werden sollte, ob eine Übertragung der Linkermodule auf andere Spezifitäten ebenfalls in schaltbaren Antikörperfragmenten resultiert. In insgesamt fünf von sechs getesteten Spezifitäten mit sehr unterschiedlichen Affinitäten und Antigenen bewirkten ausgewählte Linkervarianten eine peptidabhängige Modulation der Affinität. Dies deutet darauf hin, dass eine Übertragung des Calmodulin/M13-Peptid-basierten Systems auf viele andere scFv-Spezifitäten möglich ist.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch andere Calmodulin-Bindepeptide alternativ zum M13-Peptid eingesetzt werden können. Einige Peptide zeigten überdies einen stärkeren affinitätsmodulierenden Effekt als das initial getestete M13-Peptid. Ferner konnte in manchen Fällen auch eine Umkehrung des Schaltverhaltens beobachtet werden.

Zudem konnte exemplarisch an einer scFv-CaM-Variante gezeigt werden, dass die M13-Peptid-abhängige Abnahme der Affinität sehr wahrscheinlich auf einer Änderung der Paratopstruktur des scFvs beruht und Dimerisierung und Aggregation hierbei keine Rolle spielen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass im Rahmen dieser Arbeit ein universelles linkerbasiertes System zur Modulation von Antikörper-Antigen-Bindungsaffinitäten in scFv-Fragmenten generiert werden konnte.

1.1 Abstract

ScFv (single-chain fragment variable) antibody fragments are used in a variety of applications, such as for research, diagnostic purposes and even as therapeutics. Essential for most applications, e.g. the purification of proteins, is the extraordinary specificity, selectivity and affinity of the antibodies. However, the usually very high affinity of antibodies requires harsh elution conditions for the proteins to be purified, which typically impairs folding, integrity or viability of the eluted materials. Therefore, antibodies which retain their specificity while being adjustable in respect of their affinity would be advantageous. Conformational changes in the linker between the V_H and V_L , constituting an scFv fragment, can affect the conformation of the antigen binding site itself, resulting in a modulation of affinity.

In this work, all possible orientations of a circularised calmodulin (CaM) molecule were inserted as a linker between V_H and V_L of lysozyme binding scFv (D1.3). CaM undergoes large conformational changes depending on the presence of calcium and CaM-binding peptides. Preincubation with the conformation-modulating M13 peptide, in the presence of calcium, led to significant changes in antigen binding. This proved to be the case for several different calmodulin linker configurations in scFv D1.3. More importantly, antibodies could be released from their antigen by adding M13 peptide and calcium. The most promising CaM-linker variants were applied to other scFv of different specificity, ranging from proteins to haptens, to check whether they provide a general solution for antibody affinity modulation. For five out of six tested scFv fragments, the identified linkers resulted in a significant “affinity-switch”, suggesting that this approach may be applicable to many other scFv fragments for modulation of antibody affinity.

Moreover, additional calmodulin-binding peptides, such as known high affinity mutants and truncated variants of peptide M13, were analysed with regard to affinity modulating properties. Most of the tested peptides resulted in a change in binding signal in at least one of the analysed scFv-CaM-fusion proteins. Some of the identified peptides resulted in an even more distinct change in binding signal than the wildtype variant of M13. Thus, an inverse switching behaviour in comparison to the signal change induced by M13 was observed for certain peptide candidates.

Further testing was done to assure that “switching” is due to a change in paratope structure of the scFvs, rather than to dimerisation and aggregation. The results obtained exemplary for one scFv-CaM-variant, showing a distinct decrease of binding signal in response to peptide M13, indicated that a loss in binding affinity is based on a change in paratope structure, at least for this particular fusion protein.

In summary, a universal linker-based system to modulate antibody-antigen binding affinities in scFv-fragments was established in this work.

2 Einleitung

2.1 Antikörper

Antikörper (Immunglobuline) sind ein essentielles Element des Immunsystems der Wirbeltiere. Man unterscheidet zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunantwort, wobei Antikörper ein wesentlicher Bestandteil der erworbenen Immunität sind. Bei der erworbenen oder auch adaptiven Immunantwort kommt es bei Kontakt eines Individuums mit einer körperfremden Substanz (auch Antigen genannt) zu einer Produktion von Antikörpern durch B-Lymphozyten. B-Lymphozyten differenzieren nach Kontakt mit dem Antigen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen. Antikörper können opsonisierend und neutralisierend wirken und im gebundenen Zustand eine Aktivierung des Komplementsystems bewirken. Es gibt fünf verschiedene Immunglobulinklassen: IgG, IgA, IgM, IgD und IgE, wobei IgG zusätzlich in vier (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) und IgA in zwei (IgA1, IgA2) Subklassen unterteilt wird. Nach Aktivierung eines B-Lymphozyten kommt es oft zu einem Wechsel der Antikörperklasse, die Spezifität ändert sich jedoch nicht (Janeway *et al.*, 2002; Neumann, 2008).

Die höchste Prävalenz im Serum besitzt der IgG-Isotyp. Ein IgG-Molekül besitzt eine relative Masse von ungefähr 150 kDa und besteht aus zwei identischen schweren Polypeptidketten (*heavy chain*, jeweils ca. 50 kDa) und zwei identischen leichten Polypeptidketten (*light chain*, jeweils ca. 25 kDa) (vgl. Abb. 2.1). Die leichten Ketten bestehen aus zwei Domänen, wohingegen die schweren Ketten aus vier Domänen und einer verbindenden *Hinge*-Region zusammengesetzt sind. Jede Domäne besteht aus ungefähr 110 Aminosäuren. Die aminoterminalen Domänen werden als variable Regionen bezeichnet (V_H und V_L) und legen die Antigenspezifität eines Antikörpers fest. V_L und V_H bestehen aus drei hypervariablen Regionen und vier Gerüstregionen (*framework regions*). Durch Zusammenlagerung der drei hypervariablen Schleifen von V_L und V_H bildet sich die Antigenbindungsstelle (Paratop). Das Paratop besitzt eine Oberflächenstruktur, die komplementär zum Antigen ist, weshalb die hypervariablen Bereiche auch als komplementaritätsbestimmende Regionen (*complementarity determining regions*, CDR) bezeichnet werden. Darüber hinaus besteht ein Antikörper aus konstanten Regionen. Jede leichte Kette besitzt eine konstante Domäne (C_L), wohingegen jede schwere Kette eines IgG drei konstante Domänen (C_{H1} bis C_{H3}) besitzt. Die C_{H1} -Domäne ist mit den C_{H2} - und C_{H3} -Domänen über die flexible *Hinge*-Region verbunden. Die C_{H2} - und C_{H3} -Regionen bilden den sogenannten Fc-Teil (*fragment crystallizable*), welcher für die Vermittlung von Effektorfunktionen, wie der Aktivierung des Komplementsystems und der Bindung von Makrophagen, verantwortlich ist. Disulfidbrücken unter und innerhalb der einzelnen Ketten bewirken eine Stabilisierung der

2 EINLEITUNG

Antikörperstruktur, welche zusätzlich durch nicht-kovalente Wechselwirkungen unterstützt wird (Janeway *et al.*, 2002; Neumann, 2008).

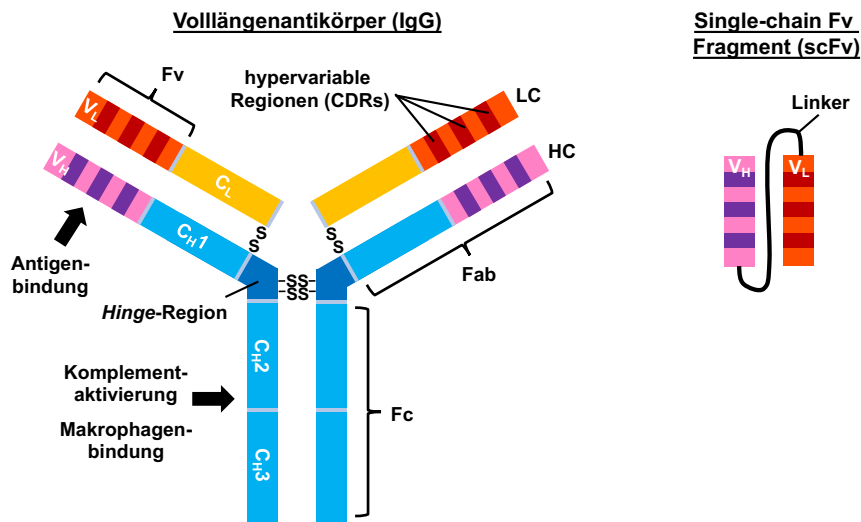


Abb. 2.1: Aufbau von Volllängenantikörpern und Antikörperfragmenten

Dargestellt ist der schematische Aufbau eines IgG-Antikörpers (links) und eines *single-chain* Fv Fragments (rechts). Abkürzungen, LC: leichte Kette; HC: schwere Kette; V_H/V_L: variable Region der schweren/leichten Kette; C_H1/2/3: konstante Regionen der schweren Kette; C_L: konstante Region der leichten Kette; SS: Disulfidbrückenbindungen; Fab: *fragment antigen binding*; Fc: *fragment crystallizable*; Fv: *fragment variable*. Abbildung modifiziert nach Dübel, 2007.

2.1.1 Antikörperfragmente

Neben den Volllängenantikörpern haben sich für eine Vielzahl von Anwendungen Antikörperfragmente etabliert. Mittels proteolytischer Spaltung lassen sich Immunglobuline fragmentieren. Durch Verdau mit der Protease Papain lässt sich ein IgG in drei ungefähr gleich große Teile spalten. Hierbei entstehen zwei identische Fab-Fragmente (*fragment antigen binding*; ca. 50 kDa), die die variablen Regionen enthalten und weiterhin in der Lage sind, Antigen zu binden. Die Stabilisierung erfolgt durch eine Disulfidbrücke zwischen C_H1 und C_L. Des Weiteren entsteht ein Fc-Fragment, welches keine antigenbindende Aktivität besitzt. Bei Verdau mit Pepsin erhält man ein F(ab')₂-Fragment. In dieser Form bleiben beide Fab-Fragmente über Disulfidbrücken miteinander verbunden, da die Spaltung vom Fc-Teil im unteren Bereich der *Hinge*-Region erfolgt. Der Fc-Teil wird hingegen in viele kleine Stücke fragmentiert. Sowohl Fab- als auch F(ab')₂-Fragmente können im Gegensatz zu Volllängenantikörpern keine Effektorfunktionen vermitteln, da hierfür der Fc-Teil essentiell ist (Janeway *et al.*, 2002). Fehlende Effektorfunktionen können allerdings bei therapeutischer Anwendung von Antikörperfragmenten von Vorteil sein, da durch den Fc-Teil verursachte unerwünschte Nebenwirkungen vermieden werden (Weir *et al.*, 2002).

Heutzutage ist es möglich, mittels gentechnischer Methoden weitere Antikörperfragmente rekombinant zu erzeugen. Das wichtigste Teilstück eines Volllängenantikörpers ist das

2 EINLEITUNG

antigenbindende Fv-Fragment (*fragment variable*), welches aus den variablen Regionen einer schweren (V_H) und leichten Kette (V_L) besteht (Janeway *et al.*, 2002). Durch fehlende Disulfidbrückenbindungen ist eine Stabilisierung des Fv-Fragments durch einen kurzen Polypeptidlinker notwendig. Dadurch entsteht eine durchgängige Polypeptidkette, weshalb Fv-Fragmente auch als scFv-Fragmente (*single-chain fragment variable*; ca. 25-30 kDa) bezeichnet werden (Bird *et al.*, 1988; Huston *et al.*, 1988). Stabilisierende Polypeptidlinker bestehen meistens aus 15-25 Aminosäuren. Oft beinhalten die Linker eine Aneinanderreihung von (Gly₄Ser)-Wiederholungen, die ihren Ursprung in den unstrukturierten Linkern des filamentösen Bakteriophagen-Haupthüllprotein III haben (van Wezenbeek & Schoenmakers, 1979). Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Zusammensetzung und Länge des Linkers einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität und Affinität eines scFvs hat (Hudson & Kortt, 1999; Whitlow *et al.*, 1993). Bei Verkürzung des Linkers kann es zur Bildung von scFv-Dimeren (auch Diabodies) und Aggregaten kommen, wodurch die Affinität des scFvs beeinflusst werden kann (Holliger *et al.*, 1993).

Ein großer Vorteil kleinerer Fragmente gegenüber Volllängenantikörpern im Hinblick auf therapeutische Anwendungen besteht in der verbesserten Penetration von Tumorgewebe (Jain, 1990; Yokota *et al.*, 1992). Ein Nachteil ist oft die geringe Halbwertszeit im Serum, die jedoch mithilfe verschiedener Methoden wie PEGylierung (Chapman *et al.*, 1999) oder Fusion an Albumin (Smith *et al.*, 2001) verbessert werden kann. Eine geringe Halbwertszeit kann allerdings auch von Vorteil sein, wenn ein sehr kurzer Wirksamkeitszeitraum benötigt wird.

Ferner können Antikörperfragmente sehr einfach und vergleichsweise kostengünstig in prokaryotischen Expressionssystemen produziert werden (Carter *et al.*, 1992; Kipriyanov *et al.*, 1997), wohingegen aufgrund der Glykosylierung die Produktion von Volllängenantikörpern in eukaryotischen Systemen erfolgen muss (Li *et al.*, 2010). Die Produktion von Fragmenten erfolgt überwiegend im Cytoplasma von *E. coli*. Die korrekte Faltung ist jedoch meistens nur im oxidativen Milieu möglich. Hierfür erfolgt die Fusion der Antikörperfragmente mit einem Signalpeptid, welches die Translokation der exprimierten Proteine ins Periplasma der Zellen bewirkt, wo die finale Faltung erfolgen kann (Dübel *et al.*, 1992; Skerra & Plückthun, 1988).

Der gegen Lysozym gerichtete Fab bzw. scFv D1.3 hat sich im Laufe der Jahre zu einem Modellantikörper entwickelt. Die dreidimensionale Struktur des Fab D1.3-Lysozym-Komplex wurde erstmals 1984 kristallographisch bestimmt und beschrieben. Er gilt als erster beschriebener Antigen-Antikörper-Komplex eines Antikörperfragments mit einem komplexen Proteinantigen (Amit *et al.*, 1984, 1986). Im Folgenden wurde die Interaktion zwischen Antigen und Antikörperfragment genauer analysiert, z. B. durch Bestimmung der Aminosäurereste, die für die Interaktion essentiell sind. Ferner konnten Mutanten generiert werden, die eine höhere Affinität zu Lysozym aufzeigten als der Wildtyp (Hawkins *et al.*, 1993; VanAntwerp & Wittrup, 1998).

Aufgrund der nahezu vollständigen Charakterisierung von D1.3 eignet sich dieser hervorragend als Modellsystem zur Untersuchung von möglichen Parametern, die einen Einfluss auf die

2 EINLEITUNG

Stabilität, Affinität oder Expressionsrate von Antikörperfragmenten haben könnten (Cai *et al.*, 2008).

2.2 Affinität

Der Begriff der Affinität beschreibt die Stärke der reversiblen Assoziation zweier Interaktionspartner (z. B. Antikörper und Antigen) aufgrund nicht-kovalenter Wechselwirkungen. Die Stärke der Bindung hängt dabei von der Assoziationsrate ab, welche proportional zur Assoziationsratenkonstante ist (k_{on}/k_a), sowie der Dissoziationsrate, welche proportional zur Dissoziationsratenkonstante (k_{off}/k_d) ist. Eine starke Interaktion wird dabei von einer hohen Assoziations- und niedrigen Dissoziationsrate bestimmt. Das Verhältnis lässt sich auch mit folgender Formel beschreiben:



AK: Antikörper; AG: Antigen; k_a : Assoziationsratenkonstante; k_d : Dissoziationsratenkonstante; AK-AG: Antikörper-Antigen-Komplex

Ein Maß für die Affinität stellt die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) dar. Diese hängt direkt von der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante ab und lässt sich wie folgt bestimmen:

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} \quad (2.2)$$

K_D : Gleichgewichtsdissoziationskonstante; k_a : Assoziationsratenkonstante; k_d : Dissoziationsratenkonstante

Liegt das Antigen im molaren Überschuss zum Antikörper vor, beschreibt der K_D -Wert die Antigenkonzentration, bei der 50 % der Antikörpermoleküle in gebundener Form vorliegen. Dies gilt unter der Voraussetzung, dass alle Antigenbindestellen allen Antikörperbindestellen zugänglich sind und dass keine Aviditätseffekte auftreten. Avidität beschreibt die Bindungsstärke einer multivalenten Bindung zwischen Antigen und Antikörper. Die Affinität ist somit umso höher, je geringer der K_D -Wert ausfällt (Roskos *et al.*, 2007).

Es gibt verschiedene Methoden zur Bestimmung des K_D -Wertes. Dazu zählt die Bestimmung mittels zellbasierter Titration (Chao *et al.*, 2006; VanAntwerp & Wittrup, 2000), ELISA (Friguet *et al.*, 1985) oder Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (Karlsson & Fält, 1997).

2.3 Anwendungen für Antikörperfragmente

Antikörper werden heutzutage in der Forschung und Diagnostik für eine Vielzahl von Standardmethoden benötigt, wie dem ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (Engvall & Perlmann, 1971), Western Blot (Towbin *et al.*, 1979), Immunhistochemie (Sternberger *et al.*, 1970), Durchflusszytometrie (Jung *et al.*, 1993), Zellseparation (Herzenberg *et al.*, 2002; Miltenyi *et al.*, 1990) und Reinigung von Proteinen (Arnold-Schild *et al.*, 2000; Einhauer & Jungbauer, 2001). Viele dieser Methoden basieren hauptsächlich auf Volllängenantikörpern, wobei ein Tausch gegen Antikörperfragmente in vielen Bereichen möglich wäre.

Ein weiterer großer Anwendungsbereich ist die Selektion von Antikörpern mittels verschiedener Display-Methoden, wie dem Phagen- (vgl. 2.4.1) (Breitling *et al.*, 1991; McCafferty *et al.*, 1990), Hefe- (Boder & Wittrup, 1997), Ribosomen- (Hanes & Plückthun, 1997) und bakteriellen Display (Francisco *et al.*, 1993). Hierbei erfolgt in allen Fällen eine Kopplung des Phänotyps (Antikörper) mit dem korrespondierenden Genotyp (genetisches Material, welches für den Antikörper kodiert) und eine darauffolgende Selektion von Antikörpern mit gewünschten Eigenschaften aus einer zuvor erzeugten Genbibliothek mit möglichst hoher Diversität (Hoogenboom, 2005). Systeme, die auf prokaryotischen Expressionssystemen beruhen, wie der Phagen- und bakterielle Display, sind auf eine Präsentation von Antikörperfragmenten beschränkt, wobei das scFv-Format meistens bevorzugt eingesetzt wird. Nach erfolgreicher Selektion neuer Varianten kann die Umwandlung in einen Volllängenantikörper erfolgen, falls dieses Format für die Endanwendung gewünscht wird. Mithilfe dieser Display-Technologien lassen sich Antikörper gegen nahezu alle denkbaren Antigene generieren. Zahlreiche therapeutische Antikörper konnten mittels Phagen-Display erzeugt werden (Nixon *et al.*, 2014). Bei Generierung von Antikörpern zur Untersuchung des humanen Proteoms haben sich diese Technologien ebenfalls als nützlich erwiesen (Dübel *et al.*, 2010).

Ferner sind scFv-Fragmente ein essentieller Teil verschiedener antikörperbasierter Ansätze zur Krebstherapie. Ein relativ früher Ansatz basiert auf der Fusion eines gegen den humanen Interleukin-2 Rezeptor gerichteten scFv-Fragments mit einer modifizierten Form des Exotoxin A (PE40) (Hwang *et al.*, 1987; Kondo *et al.*, 1988) aus *Pseudomonas aeruginosa*. Es konnte gezeigt werden, dass die konstruierten scFv-PE40-Fusionen ein hohes zytotoxisches Potential gegen IL-2-Rezeptor exprimierende Zelllinien aufwiesen (Chaudhary *et al.*, 1989). Solche scFv-Toxin-Fusionen werden auch als Immunotoxine bezeichnet. Es gibt auch Immunotoxine, die die Interaktion zwischen Liganden und korrespondierenden Rezeptoren ausnutzen. In den USA wurde 1999 das erste und bis jetzt einzige Immunotoxin (Denileukin Diftitox/Ontak®) von der FDA (*food and drug administration*) zur Therapie von kutanem T-Zell-Lymphom (CTCL) zugelassen. Hierbei handelt es sich um eine Fusion aus IL-2 und einer trunkierten Form des Diphtherietoxins, welche ebenfalls IL-2-Rezeptor-exprimierende Zellen als Ziel hat (Olsen *et al.*, 2001; Pastan *et al.*, 2006).

2 EINLEITUNG

Darüber hinaus gibt es Therapieansätze, die auf bispezifischen Antikörpern (BiTEs, *bispecific T cell engagers*) beruhen. Hierbei erfolgt die Aktivierung und Vernetzung von T-Zellen mit Tumorzellen durch bispezifische Antikörper, die sowohl an Oberflächenantigene der T-Zellen als auch an die der Tumorzellen binden (Baeuerle & Reinhardt, 2009). Ursprünglich wurde das System mit Volllängenantikörpern entwickelt, die auch als Hybridantikörper bezeichnet wurden (Staerz *et al.*, 1985). ScFv-basierte BiTEs entstehen durch Fusion zweier scFv-Fragmente mithilfe eines kurzen flexiblen Linkers, wodurch eine durchgängige Polypeptidkette entsteht. Schon in ersten Studien konnte gezeigt werden, dass ein CD3/17-1A-bispezifischer scFv in nanomolaren Konzentrationen zu einer effizienten Aktivierung und Vernetzung von T-Zellen mit 17-1A-positiven Zellen führte (Mack *et al.*, 1995). In den USA wurde im Dezember 2014 der erste scFv-basierte BiTE (Blinatumomab/Blincyto®) zur Therapie einer speziellen Form der akuten lymphatischen Leukämie (R/R ALL) zugelassen. Blinatumomab ist ein CD3/CD19-bispezifischer scFv, der CD3-positive T-Zellen mit CD19-positiven B-Zellen vernetzt und letztendlich eine Lyse der CD19-positiven Zellen bewirkt (Przepiorka *et al.*, 2015; Topp *et al.*, 2011).

Die CAR (*chimeric antigen receptor*)-T-Zell-Therapie beruht ebenfalls auf scFv-Fusionsproteinen, die als chimärer Antigenrezeptor auf T-Zellen präsentiert werden. CARs bestehen zumeist aus einem gegen das Zielantigen gerichteten scFv, der über einen Linker mit einer Transmembran- und intrazellulären Signaldomäne verknüpft ist (Gill & June, 2015). Diese Form der scFv-basierten Therapie zeigte bis jetzt besonders im Bereich hämatologischer Erkrankungen, wie B-Zell-Lymphomen, Erfolg (Brentjens *et al.*, 2013; Porter *et al.*, 2011).

2.3.1 Antikörper und Antikörperfragmente mit modulierbarer Affinität

In vielen der zuvor beschriebenen Anwendungen wäre die Verwendung eines Antikörpers, welcher bei Änderung der Reaktionsbedingungen oder Zugabe eines externen Stimulus die Affinität zum Antigen verändert von Vorteil. Bei der Reinigung von Proteinen über antikörperbasierte Affinitätschromatographie sind aufgrund hoher Affinitäten oft harsche Elutionsbedingungen notwendig, um das Zielprotein vom Säulenmaterial lösen zu können (Moser & Hage, 2010). Dies kann jedoch dazu führen, dass die Faltung, Integrität oder Viabilität des eluierten Materials negativ beeinflusst wird. Somit wären Antikörper mit hoher Antigenspezifität und gleichzeitig modulierbarer Affinität unter physiologischen Bedingungen von Vorteil.

Es existieren bereits einige Ansätze zur Erzeugung von Antikörpern mit modulierbarer Affinität. Die meisten beschriebenen Systeme beruhen auf einer pH-abhängigen Schaltbarkeit. Der pH-Unterschied, der zur Änderung der Bindungsstärke führt, liegt idealerweise im physiologischen Bereich (pH 6-8). Die Generierung pH-abhängiger Antikörper erfolgt meistens durch Einbringung von ionisierbaren Histidinresten in die CDRs der jeweiligen Antikörper. Im ersten Schritt wird eine Histidin-Scanning-Bibliothek erzeugt, aus der im zweiten Schritt mittels verschiedener Display-Methoden Varianten selektiert werden können, die in einem pH-Bereich um pH 7,4 eine hohe Affinität und Spezifität für das Antigen zeigen. Eine Lösung der Bindung erfolgt durch

2 EINLEITUNG

Absenkung des pH (pH 5,5-6,0) (Murtaugh *et al.*, 2011; Schröter *et al.*, 2015). Ein direktes Screening zur Identifizierung passender Varianten ohne vorherige Selektion führte zu ähnlichen Ergebnissen (Igawa *et al.*, 2010). Überdies konnte gezeigt werden, dass eine *de novo*-Isolierung neuer Antikörperspezifitäten mit pH-abhängigen Bindungseigenschaften aus einer zuvor histidinangereicherten Genbibliothek mittels Phagen-Display möglich ist (Bonvin *et al.*, 2015).

Des Weiteren konnten mittels Phagen-Display calciumabhängige Antikörper generiert werden, die nur im calciumgebundenen Zustand in der Lage sind, ihr Antigen zu binden (Hironiwa *et al.*, 2016; Thie *et al.*, 2014).

Die so gefundenen Lösungen sind jedoch stets nur für einen Antikörper anwendbar, für den entsprechende Mutationen erzeugt wurden. Ein für verschiedene Antikörper anwendbares Schaltprinzip wäre hier vorteilhafter. Dies wäre theoretisch z. B. durch einen allosterischen Effekt möglich, welcher außerhalb der Bindungsregionen induziert wird und somit keine direkte Mutation in den V-Regionen selbst erfordert. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Konformationsänderungen in der Linkerregion zwischen V_H und V_L eines scFv-Fragments die Konformation der Antigenbindestelle beeinflussen können, woraus eine Modulation der Affinität resultiert (Dübel, 2005). Das normalerweise stabilisierende scFv-Linkerpeptid trägt nicht zur Antigenbindung bei und ist typischerweise flexibel, da es mit einer Vielzahl von V_H und V_L -Paarungen kompatibel ist (vgl. 2.1.1). Somit sollte es möglich sein, durch Austausch des Linkers gegen eine Einheit, die stimulusabhängig unter physiologischen Bedingungen ihre Konformation verändert, ein System zu entwickeln, welches universell auf unterschiedlichste scFvs übertragbar ist. In ersten Versuchen konnte gezeigt werden, dass der Austausch des $(G_4S)_3$ -Linkers gegen elastinartige Polypeptide in temperaturabhängigen scFv-Varianten resultiert (Megeed *et al.*, 2006). Überdies konnte durch Einfügen einer Calmodulin-M13-Peptid-Fusion in die Linkerregion von scFv D1.3 eine calciumabhängige Änderung der Affinität beobachtet werden (Kobatake *et al.*, 2012). Ob eines der Systeme allerdings universell auf andere scFv-Spezifitäten mit anderen Antigenklassen übertragbar ist, wurde bisher jedoch nicht gezeigt.

2.4 Calmodulin

Calmodulin (CaM) gehört zur Familie der Calcium-Bindeproteine. Es ist ein relativ kleines (148 Aminosäurereste), saures, in Eukaryoten ubiquitär vorkommendes und zudem hochkonserviertes Protein, welches bei Änderung der cytosolischen Calciumkonzentration durch Modulierung zahlreicher Bindepartner eine Übertragung des Calciumsignals auf zelluläre Prozesse bewirkt. Calmodulin besteht aus zwei globulären terminalen Domänen, die über eine flexible Helix miteinander verbunden sind (vgl. Abb. 2.2) (Cheung, 1980; Crivici & Ikura, 1995). Calmodulin besitzt vier EF-Hand-Motive, bei denen es sich um spezifische Aminosäuresequenzmotive handelt, die durch ihre Ladung in der Lage sind, Ca^{2+} -Ionen mit hoher Affinität zu binden (Kretsinger & Nockolds, 1973; Lewit-Bentley & Réty, 2000). Die Dissoziationskonstante (K_D) für

2 EINLEITUNG

Calcium liegt dabei im mikromolaren Bereich, wobei die C-terminale Domäne eine ca. 10-fach höhere Affinität besitzt als die N-terminale Domäne (Haiech *et al.*, 1981; Lin *et al.*, 1974). Durch Bindung von Calcium kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins von einer geschlossenen (Kuboniwa *et al.*, 1995) zu einer offenen Konformation (Chattopadhyaya *et al.*, 1992), wodurch der Abstand zwischen N- und C-Terminus in der calciumgebundenen Form am höchsten ist. Ca^{2+} -CaM besitzt eine hohe Affinität zu zahlreichen Interaktionspartnern, wobei die Bindung der Interaktionspartner erneut eine Änderung der Konformation zu einer geschlossenen, sogenannten gebundenen Form (Ikura *et al.*, 1992) bewirkt. Eine Übersicht hierzu ist in Abb. 2.2 dargestellt.

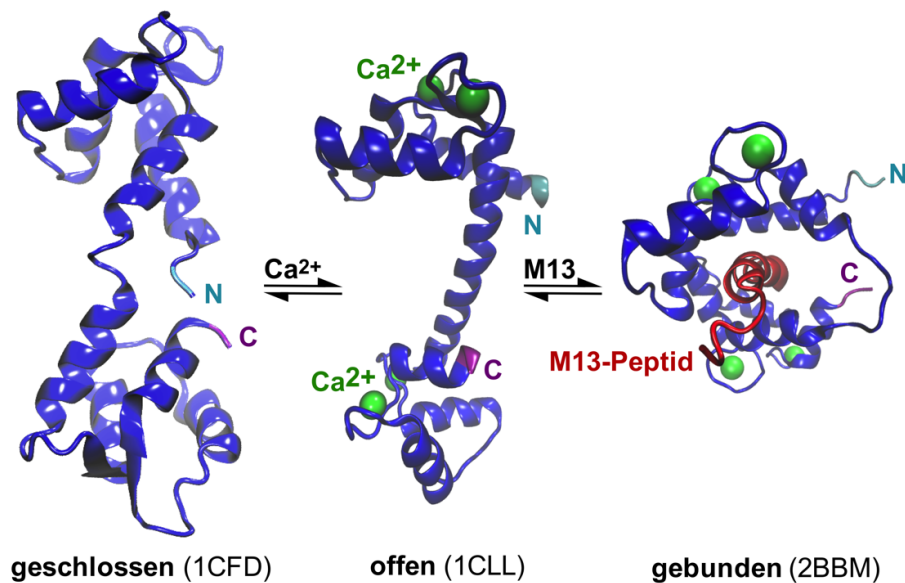


Abb. 2.2: Überblick zur stimulusabhängigen Konformationsänderung in Calmodulin

In calcium- und peptidfreier Form adaptiert Calmodulin eine geschlossene Konformation (PDB ID: 1CFD) (Kuboniwa *et al.*, 1995). Bei Bindung von Calcium nimmt es die sogenannte offene Form ein, bei der N- und C-Terminus den größten Abstand zueinander aufweisen (PDB ID: 1CLL) (Chattopadhyaya *et al.*, 1992), wohingegen die Termini sich bei zusätzlicher Bindung eines Calmodulin-Bindepeptids (CBP), wie das M13-Peptid, aneinander annähern (PDB ID: 2BBM) (Ikura *et al.*, 1992).

Der jeweilige Interaktionspartner wird durch Bindung von Calmodulin moduliert. Es existieren verschiedene Regulationsmechanismen, die sich in Klassen unterteilen lassen. Eine Gruppe bindet Calmodulin nahezu irreversibel unabhängig von der Calciumkonzentration, wodurch Calmodulin eher als Untereinheit dieser Proteine angesehen wird. Bei Calciumbindung kommt es zur Aktivierung der Proteinpartner. Hierzu gehört u.a. die Phosphorylase-Kinase (Cohen *et al.*, 1978). Eine weitere Gruppe bindet Apo-CaM (d.h. die calciumungebundene Form) und dissoziiert bei Anwesenheit von Calcium. Diese Proteine fungieren wahrscheinlich als intrazelluläres CaM-Reservoir (Yuechueng & Storm, 1990), welche CaM bei Anstieg der Calciumkonzentration freisetzen und somit den Proteinpartnern zugänglich machen, die durch Ca^{2+} -CaM gebunden und aktiviert werden (Chin & Means, 2000). Eine dritte Klasse umfasst smMLCK (*smooth muscle myosin light chain kinase*) (Meador *et al.*, 1993) und Calcineurin (Kincaid *et al.*, 1988). In

2 EINLEITUNG

Anwesenheit niedriger Calciumkonzentrationen bilden sie niedrigaffine Komplexe mit Calmodulin, die bei Anstieg des Calciumlevels in hochaffine Bindungen übergehen und dadurch aktiviert werden. Der Mechanismus einer weiteren Effektor-Klasse unterscheidet sich nur gering von dieser Form der Interaktion. Zu dieser Klasse gehören u.a. die CaM-abhängigen Proteinkinasen I, II und IV (Meador *et al.*, 1993), welche ausschließlich bei hohen Calciumkonzentrationen durch Ca^{2+} -CaM gebunden und aktiviert werden. Ferner gibt es Bindepartner, die bei Bindung von Ca^{2+} -CaM inaktiviert werden (Chin & Means, 2000).

Aufgrund der Komplexität der meisten Interaktionspartner wurden viele der bisher veröffentlichten Strukturmodelle mithilfe kurzer Peptidsequenzen gewonnen, welche für die Interaktion der jeweiligen Proteinpartner mit Calmodulin essentiell sind. Trotz hoher Affinitäten (10^{-9} bis 10^{-10} M) besitzen die CaM-Bindepartner kein spezifisches, gemeinsames Aminosäuresequenzmotiv, welches für die Interaktion verantwortlich ist. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Bindepeptide in CaM-gebundener Form basische, amphipathische α -Helices ausbilden, die für die Ausbildung der Wechselwirkungen zwischen Calmodulin und Bindepartner essentiell sind (O'Neil & DeGrado, 1990). Hierbei spielen vor allem bestimmte hydrophobe Aminosäurereste eine wichtige Rolle, die daher auch als hydrophobe Anker bezeichnet werden (Crivici & Ikura, 1995). Eine Übersicht über CaM-Bindedomänen verschiedener CaM-Bindeproteine und putative hydrophobe Ankerreste ist in Tab. 2.1 dargestellt.

Tab. 2.1: Übersicht von Aminosäuresequenzen verschiedener Calmodulin-Bindepeptide (modifiziert nach Crivici & Ikura, 1995; Hultschig *et al.*, 2004)

abgeleitet von	Aminosäuresequenz	Referenz
skMLCK (M13)	KRR W KKN I AV S AAN F KKISSSGAL	Blumenthal <i>et al.</i> , 1985
smMLCK	ARR K WQKTGHAVRAIG L SS	Meador <i>et al.</i> , 1993
CaMKII	ARR K LKGALIT T MLAT R NFS	Meador <i>et al.</i> , 1993
Caldesmon	G V R NIKSM W EKGN V FSS	Zhang & Vogel, 1994
Calspermin	ARR K LKAA V KAVVASS L GS	Ono <i>et al.</i> , 1989
Phosphofructokinase	FMNNWEV Y KLL A HIRPPAP K SGSYTV	Buschmeier <i>et al.</i> , 1987
Calcineurin	ARKEV I RNK I RA I GKMAR V FSVLR	Kincaid <i>et al.</i> , 1988
Ca^{2+} -ATPase	RGQIL W FRGLNR I QTQ I K V VNAFS	James <i>et al.</i> , 1988
PDE	RRKH L QRP I FR L RCLV K QLEK	Novack <i>et al.</i> , 1991
cNOS	KRRAIG F KK L AE A V K FS A K L MGQ	Zhang <i>et al.</i> , 1995
Neuromodulin	KAHKAAT K IQ A S F RGHIT R K L KGEKK	Apel <i>et al.</i> , 1990
α -Spektrin	KTAS P WKSAR L M V HTVAT F NSIKE	Leto <i>et al.</i> , 1989
MARCKS	KKKKR F S F KK S FKL S G F S F KK S KK	Graff <i>et al.</i> , 1991
Mastoparan	I N L K A L A LAK K I L	Malencik & Anderson, 1983
Mellitin	GIGGAV L KVLT T GL P ALIS W IKRKR	Comte <i>et al.</i> , 1983

Die Sequenzen wurden jeweils bezüglich ihrer putativen hydrophoben Anker ausgerichtet. Die hydrophoben Hauptanker sind rot und fett markiert, hydrophobe Nebenanke in blau und fett. Putativ hochkonservierte basische Reste sind grün und fett markiert.

Zu den am besten charakterisierten Interaktionspartnern gehört das M13-Peptid, bei dem es sich um die CaM-Bindedomäne (Aminosäurereste 577 bis 602) der skMLCK (*skeletal muscle myosin light chain kinase*) handelt (Ikura *et al.*, 1992). Durch Mutagenese konnten hochaffine Varianten

2 EINLEITUNG

des Peptids erzeugt werden. In einem ersten Ansatz sollten mithilfe eines Alaninscans (Cunningham & Wells, 1989) die für die Interaktion mit Calmodulin essentiellen Aminosäurereste identifiziert werden. Hierbei wurde eine Variante mit einer 1000-fach höheren Affinität im Vergleich zum Wildtyp gefunden (Montigiani *et al.*, 1996). Eine darauffolgende Studie einer anderen Arbeitsgruppe befasste sich ebenfalls mit der Identifizierung der für die Interaktion wichtigen Aminosäureseitenketten an allen möglichen Positionen des M13-Peptids. Hierfür wurde eine vollständige Aminosäureaustauschbibliothek des Peptids angefertigt, bei der jede Peptidposition mit jeder möglichen Aminosäure ausgetauscht und im Anschluss auf die Stärke der CaM-Interaktion hin untersucht wurde (Hultschig *et al.*, 2004). Es konnten weitere hochaffine Mutanten ermittelt und die zuvor von Montigiani *et al.* (1996) charakterisierte Variante verifiziert werden. Darüber hinaus unterstützten diese Ergebnisse die zuvor erwähnte Theorie über die für die CaM-CBP-Interaktion essentiellen hydrophoben Anker.

2.4.1 Nutzung der Calmodulin/Calmodulin-Bindeprotein-Interaktion als reversiblen Affinitäts- und Immobilisierungstag

Bedingt durch die hohen Affinitäten zwischen Ca^{2+} -Calmodulin und Calmodulin-Bindepartnern lässt sich die reversible Interaktion als Affinitäts- und Immobilisierungstag nutzen.

Schon in frühen Studien wurde die hohe Affinität von Ca^{2+} -Calmodulin zu Fluphenazin, einem antipsychotischen Wirkstoff (Hogarty *et al.*, 1979) aus der Gruppe der Phenothiazine, zur Reinigung von Calmodulin genutzt. Hierbei erfolgte die Kopplung von Fluphenazin an Sepharose und die darauffolgende Nutzung der Fluphenazin-Sepharose zur affinitätschromatographischen Reinigung von Calmodulin (Charbonneau & Cormier, 1979). Eine andere Studie untersuchte, welche Fragmente von Calmodulin für die Interaktion mit verschiedenen Partnern, wie der zyklischen Nukleotid-Phosphodiesterase (Watterson & Vanaman, 1976), Calcineurin (Klee *et al.*, 1979), cAMP-abhängigen Proteinkinase (Hathaway *et al.*, 1981) und Fodrin (Tsukita *et al.*, 1983) essentiell sind. Es erfolgte die Kopplung drei verschiedener tryptischer CaM-Fragmente an Sepharose und darauffolgend die Reinigung verschiedener CaM-Bindepartner aus bovinem Hirn. Hierbei konnte gezeigt werden, dass diverse Enzympartner mit zum Teil unterschiedlichen Domänen von Calmodulin interagieren. Dadurch wurde eine Methode zur selektiven Reinigung von CaM-abhängigen Enzymen etabliert (Ni & Klee, 1985). Ferner wurde Calmodulin als vielseitiger Tag für scFv-Fragmente verwendet (Neri *et al.*, 1995). Der Calmodulin-Tag erwies sich als hilfreich bei der affinitätschromatographischen Reinigung der scFvs und für den Nachweis von scFv-CaM-Fusionen über fluoreszenzmarkierte Peptidpartner. Überdies konnte die hochaffine Interaktion von Calmodulin mit Peptidliganden für Heterodimerisierungsstudien genutzt werden.

Darüber hinaus wurde die bereits erwähnte Hochaffinitätsmutante des M13-Peptids (Montigiani *et al.*, 1996) als Immobilisierungstag im Phagen-Display verwendet. Hierbei erfolgt die direkte

2 EINLEITUNG

Kopplung von Geno- und Phänotyp durch Präsentation des zu selektierenden Proteins oder Peptids auf der Oberfläche eines Phagenpartikels, der die genetische Information des präsentierten Proteins, z. B. in Form eines sogenannten Phagemids (Breitling *et al.*, 1991), in sich trägt (McCafferty *et al.*, 1990; Smith, 1985). Die Selektion von Proteinen mit gewünschten Eigenschaften erfolgt im sogenannten Panning (Parmley & Smith, 1988). Bei Selektion von Antikörperfragmenten wird im ersten Schritt das Zielprotein (Antigen) an einer Oberfläche immobilisiert. Im Anschluss erfolgt die Inkubation der Antikörperphagen mit dem Antigen und die Entfernung von unspezifischen Bindern durch mehrere Waschschriffe. Zum Schluss werden spezifische Binder eluiert. Kritische Schritte sind die Immobilisierung des Antigens und die Elution der Binder. Oftmals wird die nahezu irreversible Interaktion zwischen Biotin und Streptavidin (Weber *et al.*, 1989) zur Immobilisierung von Antigenen eingesetzt, z. B. durch chemische Biotinylierung oder einem Avi-Tag im Expressionskonstrukt, der enzymatisch biotinyliert wird (Chapman-Smith & Cronan, 1999; Scholle *et al.*, 2004). Biotinylierung kann jedoch die Oberflächeneigenschaften eines Proteins ändern und dadurch zu Denaturierung oder Aggregation führen. Zusätzlich müssen gebundene Phagen unter oft harschen Bedingungen eluiert werden, was das Risiko erhöht, dass unspezifische Binder angereichert werden (Mukherjee *et al.*, 2015). Als Alternative zur Biotin/Streptavidin-Interaktion wurde ein CaM/M13-Peptid-basiertes System entwickelt. Die hochaffine Mutante des M13-Peptids wurde als C-terminaler Fusionstag mit dem Antigen exprimiert. Die Immobilisierung der M13-Antigen-Fusionen erfolgte auf Calmodulin-Beads, womit eine effiziente Anreicherung spezifischer Binder aus einer Fab-Bibliothek erreicht werden konnte. Ein weiterer Vorteil des Systems besteht in der Möglichkeit, gebundene Antikörperphagen durch Zugabe von EDTA zu eluieren (Mukherjee *et al.*, 2015).

2.4.2 Nutzung von Calmodulin als *Input*-Domäne eines schaltbaren Systems

Die calcium- und peptidabhängige Konformationsänderung von Calmodulin wurde in der Vergangenheit mehrfach zur Generierung fluoreszenter Calciumsensoren verwendet. Calmodulin dient in diesen Systemen jeweils als *Input*-Domäne, die bei Bindung von Calcium die auftretende Konformationsänderung auf die *Output*-Domäne, die aus fluoreszenten Proteinen besteht, überträgt. Durch konformationsabhängige Änderung der fluoreszenten Eigenschaften wird ein messbares *Output*-Signal geschaffen (Ha & Loh, 2012; Stratton & Loh, 2011; Vallée-Bélisle & Plaxco, 2010). Meistens werden solche Sensoren zur Evaluierung von Calcium-Signalling in Zellen und Organellen verwendet (Ishii *et al.*, 2006; Palmer & Tsien, 2006; Palmer *et al.*, 2004). Solche fluoreszenten Sensoren beruhen oft auf dem sogenannten Förster-Resonanzenergietransfer (FRET). Hierbei wird Energie strahlungsfrei von einem angeregten Donor-Chromophor auf einen zweiten Akzeptor-Chromophor übertragen (Forster, 1946). Die Energieübertragung kann in einem Abstandsbereich von 1 bis 10 nm erfolgen. Hierfür essentiell ist unter anderem die Überlappung des Fluoreszenzspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors (Clegg, 1995).

2 EINLEITUNG

Ein FRET-basiertes System wurde durch Integration von Calmodulin und M13-Peptid zwischen zwei GFP (grün fluoreszierendes Protein)-basierten FRET-Partnern erzeugt, sodass eine calciumabhängige Änderung des Signals beobachtet werden konnte. Diese Indikatoren werden auch als „cameleons“ bezeichnet (Miyawaki *et al.*, 1997; Nagai *et al.*, 2004). In einem anderen Ansatz wurde eine Calmodulin-M13-Fusion in verschiedene GFP-Varianten inseriert, wobei ebenfalls Änderungen der Fluoreszenz in Abhängigkeit von Calcium beobachtet werden konnten (Baird *et al.*, 1999; Ohkura *et al.*, 2005). In den beiden genannten Systemen wurden Calmodulin und das M13-Peptid in oder zwischen zwei Proteinpartnern inseriert, um ein messbares *Output*-Signal hervorzurufen. Es konnte allerdings mehrfach gezeigt werden, dass auch bei N- und C-terminaler Fusion von CaM und M13 an einen zuvor zirkulär permutierten fluoreszenten Partner (vgl. 2.5) ein funktioneller Calciumsensor erzeugt werden konnte (Nagai *et al.*, 2001; Nakai *et al.*, 2001).

Die zuvor beschriebenen Methoden beruhen alle auf einem einzigen Fusionsprotein, welches durch Änderung der intramolekularen Konformation bei Bindung von Calcium in der *Input*-Domäne zu einer Änderung des *Output*-Signals führt. Die Generierung eines zweigeteilten Sensors ist ebenso möglich. Bei Verwendung der CaM-Bindedomäne aus smMLCK (*smooth muscle myosin light chain kinase*) als Linkerregion zweier GFP-Varianten konnte bei Bindung von freiem Ca^{2+} -Calmodulin eine Änderung im FRET beobachtet werden (Romoser *et al.*, 1997). In Varianten der zuvor erwähnten Systeme von Miyawaki und Nagai wurden CaM und M13-Peptid voneinander getrennt und jeweils mit einem GFP-Partner oder einer Hälfte des zirkulär permutierten Proteins fusioniert. In beiden Fällen konnte die intermolekulare Interaktion der beiden Sensorteile in Anwesenheit von Calcium gezeigt werden (Miyawaki *et al.*, 1997; Nagai *et al.*, 2001).

Ein Vorteil der Nutzung von Calmodulin und einem Calmodulin-Bindepeptid als *Input*-Domäne besteht in der Reversibilität der Bindung. Bei Chelatierung der Calciumionen, z. B. durch EDTA, oder einer Verringerung der initialen Konzentration wird eine dementsprechende Änderung des Fluoreszenzsignals bewirkt, wie in zuvor genannten Publikationen gezeigt werden konnte.

2.5 Zirkuläre Permutation

Zirkuläre Permutation eines Proteins kann als die intramolekulare Verlagerung von N- und C-Terminus desselben definiert werden. Am häufigsten erfolgt dies auf genetischer Ebene und legt dadurch die Proteinstruktur fest. Allerdings ist eine Permutation auf Proteinebene durch posttranslationale Modifikation ebenfalls möglich. In beiden Fällen erfolgt im ersten Schritt die Vereinigung der ursprünglichen N- und C-Termini mithilfe eines kurzen Linkers. Im Anschluss findet der Abschluss der Permutation durch Generierung neuer Termini, z. B. durch enzymatische Spaltung statt (vgl. Abb. 2.3). Diese Änderungen können die Faltung, Stabilität, Struktur und Funktion eines Proteins beeinflussen (Meister *et al.*, 2011).

2 EINLEITUNG

Dieser Mechanismus wurde durch Sequenzvergleich als ein möglicher Mechanismus der evolutionären Entwicklung natürlich vorkommender Proteine identifiziert. Das erste durch Permutation entstandene Proteinpaar wurde 1979 durch Vergleich der Sequenzen zweier Lektine, Flavin und Concanavalin A, entdeckt (Cunningham *et al.*, 1979), wobei später gezeigt werden konnte, dass die Permutation durch posttranslationale Modifikation erfolgt (Carrington *et al.*, 1985). Weitere Proteinklassen mit einer hohen Rate an Permutationen sind Methyltransferasen (Malone *et al.*, 1995), Saposine (Ponting & Russell, 1995) und β -Glucanasen.

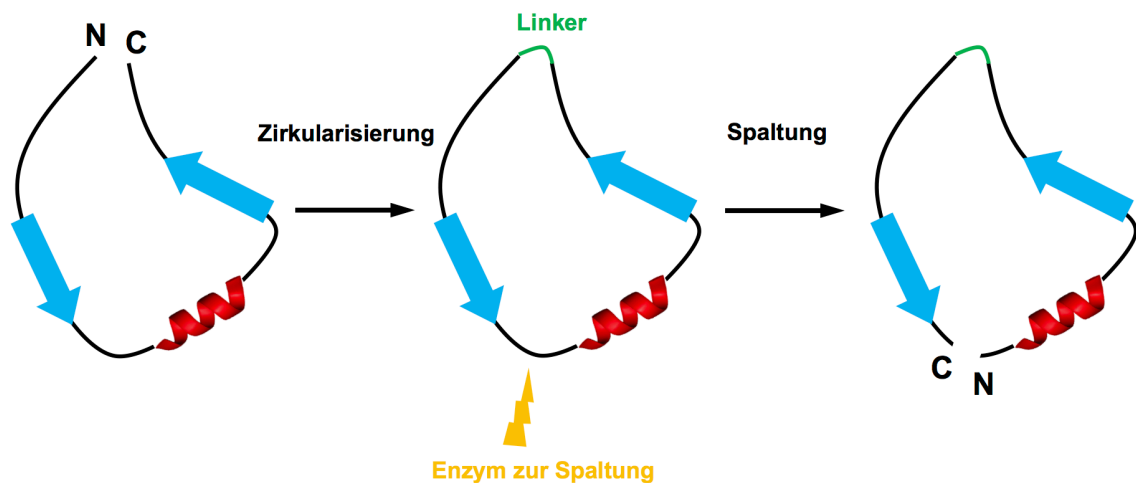


Abb. 2.3: Zirkuläre Permutation – allgemeiner Überblick

Zirkuläre Permutation kann auf Protein- (hier gezeigt) und DNA-Ebene erfolgen. Im ersten Schritt erfolgt die Vereinigung des ursprünglichen N- und C-Terminus mithilfe eines kurzen, meist flexiblen Linkers. Anschließend werden durch enzymatische Spaltung neue N- und C-Termini erzeugt, wodurch die Permutation abgeschlossen wird.

2.5.1 Methoden zur Generierung von Permutanten

Im Rahmen bisheriger Studien erfolgte die Permutation hauptsächlich auf genetischer Ebene. Eine Übersicht über verschiedene Methoden gibt Abb. 2.4. Generell kann Permutation gerichtet (d.h. gezielte Erzeugung bestimmter Varianten) oder ungerichtet (d.h. zufällig) erfolgen. Die ersten Schritte sind bei allen Vorgehensweisen identisch. Zu Beginn wird das Zielgen mithilfe geeigneter Enzyme aus dem Ursprungsvektor ausgeschnitten. Bei Design des Zielgens sollte bedacht werden, dass die flankierenden Regionen für einen kurzen, flexiblen Linker codieren, welcher bei nachfolgender Ligation im gleichen Leseraster wie das Zielgen liegt. Besonders geeignet ist ein Gly₄Ser-Linker, der naturgemäß *Bam*HI-Schnittstellen enthält. Im Folgenden erfolgt die Zirkularisierung des linearisierten Gens. Im Anschluss erfolgt die eigentliche Permutation. Dies kann gerichtet über PCR mithilfe passender Oligonukleotide erfolgen oder alternativ über gezielten Verdau mit Restriktionsenzymen. Eine gerichtete Methode ist besonders bei Erzeugung ausgewählter Varianten sinnvoll. Bei Generierung ganzer Bibliotheken komplexer

2 EINLEITUNG

Zielgene kann auch auf ungerichtete Methoden zurückgegriffen werden. Eine Möglichkeit ist der Verdau mit geringen Konzentrationen an DNaseI. Die Desoxyribonuklease fügt zufällige Doppelstrangbrüche in DNA ein, sodass bei Wahl der richtigen Enzymkonzentration exakt ein Doppelstrangbruch pro Molekül erzeugt wird. Nach *Blunting* (DNaseI-Verdau) bzw. Verdau mit geeigneten Enzymen (Permutagenese-PCR) kann die Klonierung in den Zielvektor erfolgen (Guntas *et al.*, 2004; Meister *et al.*, 2011).

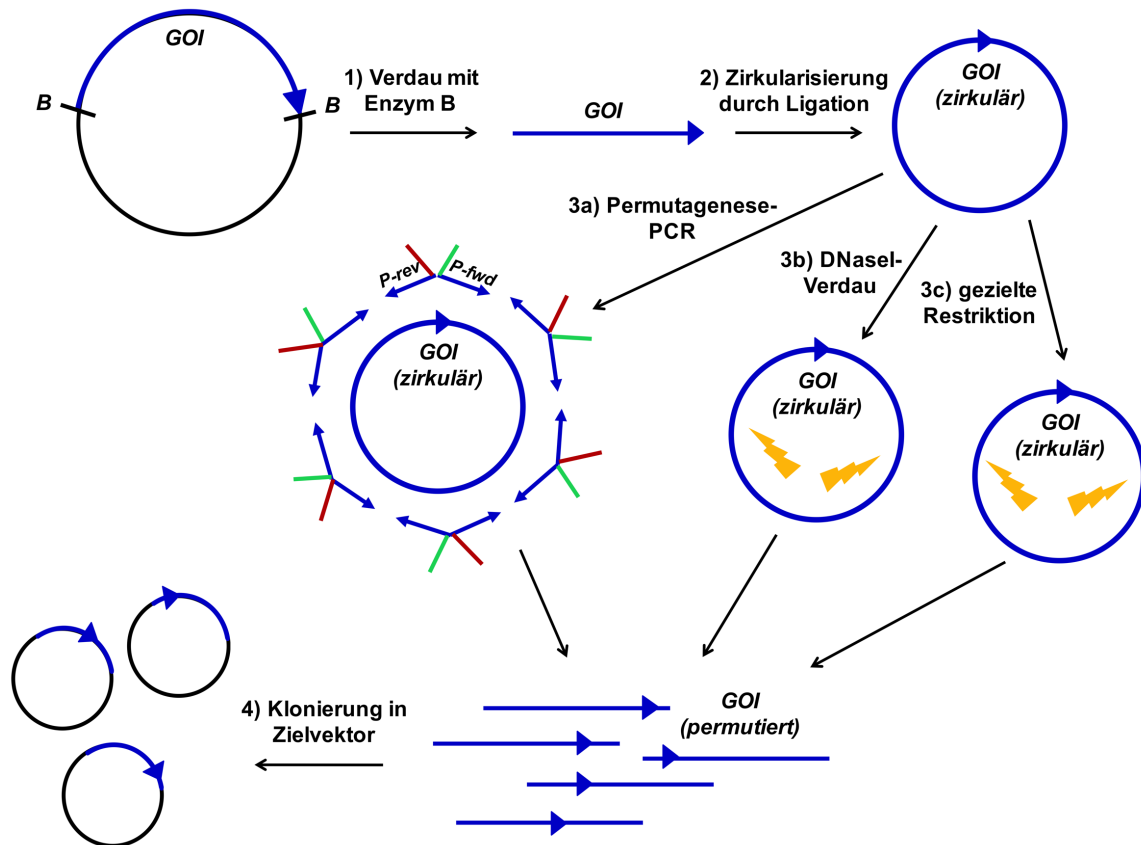


Abb. 2.4: Methoden zur Generierung genetischer Permutationen

Im ersten Schritt erfolgt die Exzision des Zielgens (GOI, *gene of interest*) aus dem Ursprungsvektor mithilfe passender Restriktionsenzyme (1). Das linearisierte Gen wird im zweiten Schritt durch Ligation zirkularisiert (2). Der nächste Schritt, das Einfügen neuer N- und C-Termini, kann auf verschiedene Weisen erfolgen. In dieser Arbeit erfolgte die Permutation gezielt mittels PCR (3a). Eine ungerichtete Methode basiert auf Verdau mit DNaseI, welche unspezifisch Doppelstrangbrüche in DNA einfügt (3b). Eine weitere gerichtete Methode ist die gezielte Restriktion mit geeigneten Enzymen (3c). Im letzten Schritt erfolgt nach Verdau mit Restriktionsenzymen (3a) bzw. *Blunting* der DNA-Enden (3b,c) die Klonierung in den Zielvektor (4).

2.5.2 Generierung von Permutanten zur Verbesserung von Proteineigenschaften

Erste Studien befassten sich mit der künstlichen Permutation von bovinem pankreatischen Trypsininhibitor zur Evaluierung des Effekts der Permutation auf Faltung und Stabilität des Proteins. Die Permutation erfolgte durch chemische Vernetzung der N- und C-Termini auf Proteinebene und darauffolgenden gezielten tryptischen Verdau. Es konnte gezeigt werden, dass

2 EINLEITUNG

sowohl die zirkuläre als auch permutierte Form nach Entfaltung durch Reduktion wieder in eine aktive Form überführt werden konnten (Goldenberg & Creighton, 1983). In späteren Studien erfolgte die Permutation größtenteils auf DNA-Ebene. Permutation der Dihydrofolatreduktase (DHFR) resultierte in einer Variante mit kinetischen Eigenschaften, die mit dem Wildtyp vergleichbar waren (Buchwalder *et al.*, 1992). Durch systematische Permutation des gesamten für DHFR codierenden Genabschnitts konnten Bereiche identifiziert werden, die für die Faltung essentielle Elemente darstellen. Die Hälfte der möglichen Permutanten konnte durch Faltung in eine enzymatisch aktive Form überführt werden (Iwakura *et al.*, 2000). Die erste Zufallspermutation erfolgte am Beispiel der Aspartat-Transcarbamoylase (ATCase) (Graf & Schachman, 1996).

Durch Permutation kann die Faltung, Stabilität, Struktur, Funktion und Topologie eines Proteins beeinflusst werden. Dies hat sich in vielen Anwendungen als vorteilhaft erwiesen (Meister *et al.*, 2011). Durch zirkuläre Permutation von Interleukin-4 (IL-4) konnte ein Immunotoxin mit verbesserter Antitumoraktivität erzeugt werden (vgl. 2.3) (Kreitman *et al.*, 1994, 1995). Der Einsatz einer permutierten OmpX (*outer membrane protein*)-Variante als Ankerprotein im bakteriellen Display führte zu einer Erhöhung der Diversität und Affinität von selektierten Peptiden (vgl. 2.3) (Rice *et al.*, 2006).

Ferner konnten Varianten erzeugt werden, die im Vergleich zum Wildtyp verbesserte Eigenschaften aufwiesen. Im Rahmen der systematischen Permutation der Dihydrofolatreduktase konnten Varianten mit einer verbesserten katalytischen Aktivität identifiziert werden (Iwakura *et al.*, 2000). Ferner konnten Permutanten der 5-Aminolävulinat-Synthase (ALAS) (Cheltsov *et al.*, 2001) und Lipase B aus *Candida antarctica* (CALB) (Qian & Lutz, 2005) mit optimierten katalytischen Eigenschaften generiert werden.

2.5.3 Erzeugung schaltbarer Systeme mittels zirkulärer Permutation

Einige der bereits erwähnten Calciumsensoren (vgl. 2.4.2) basieren auf zirkulär permutierten GFP-Varianten (Baird *et al.*, 1999; Nagai *et al.*, 2001; Nakai *et al.*, 2001). Überdies konnten durch Insertion permutierter TEM1 β -Lactamasen (BLA) in Maltose-Bindeprotein aus *E. coli* Fusionsproteine mit maltoseabhängiger β -Lactamaseaktivität generiert werden. In Anwesenheit von Maltose konnte eine 25-fach erhöhte Aktivität beobachtet werden, welche unter maltosefreien Bedingungen stark beeinträchtigt wurde (Guntas *et al.*, 2004). Ferner wurde gezeigt, dass sich Zink als negativer Regulator auf die Enzymaktivität auswirkt (Liang *et al.*, 2007). Durch zusätzliche Mutagenese in der Maltosebindestelle des Maltose-Bindeproteins konnten sucroseabhängige Varianten erzeugt werden (Guntas *et al.*, 2005). Durch Kombination einer permutierten β -Lactamase und Calmodulin wurde ein Peptidsensor entwickelt, welcher in Abhängigkeit von Calcium und M13-Peptid eine Änderung der Enzymaktivität zeigte (Meister & Joshi, 2013).

2 EINLEITUNG

Somit stellt die Kombination aus zirkulärer Permutation und Proteinen wie Calmodulin, die eine stimulusabhängige Änderung der Konformation zeigen, ein vielversprechendes Mittel zur Generierung schaltbarer Antikörpersysteme dar.

2.6 Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines universellen linkerbasierten Systems zur allosterischen Regulation von Antikörper-Antigen-Bindungsaffinitäten in scFv-Fragmenten. Calmodulin wurde aufgrund der bekannten Konformationsänderungen in Abhängigkeit von Calcium und M13-Peptid als Linker ausgewählt. Der hypothetische Mechanismus eines Calmodulin/M13-Peptid-basierten schaltbaren scFv-Systems ist in Abb. 2.5 dargestellt. Zur Ermittlung der optimalen Orientierung des CaM-Linkers sollte Calmodulin zirkulär permutiert werden. Ein „*Proof of Concept*“ sollte im gut beschriebenen gegen Lysozym gerichteten Modellantikörper scFv D1.3 erfolgen. Nach Identifizierung funktioneller CaM-Varianten sollte evaluiert werden, ob eine Übertragung des CaM/M13-Peptid-basierten Systems auf andere scFv-Spezifitäten mit anderen Affinitäten und Antigenmolekülararten möglich ist. Ferner sollte überprüft werden, ob weitere Calmodulin-Bindepeptide einen affinitätsmodulierenden Effekt haben. Darüber hinaus sollte mittels Größenausschlusschromatographie untersucht werden, ob bei der stimulusabhängigen Änderung der Affinität eine Bildung von Dimeren und Multimeren eine Rolle spielt. Überdies sollte mittels vergleichender Bestimmung von Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_D) evaluiert werden, ob die initiale Affinität eines scFvs durch die Integration eines CaM-Linkers beeinflusst wird.

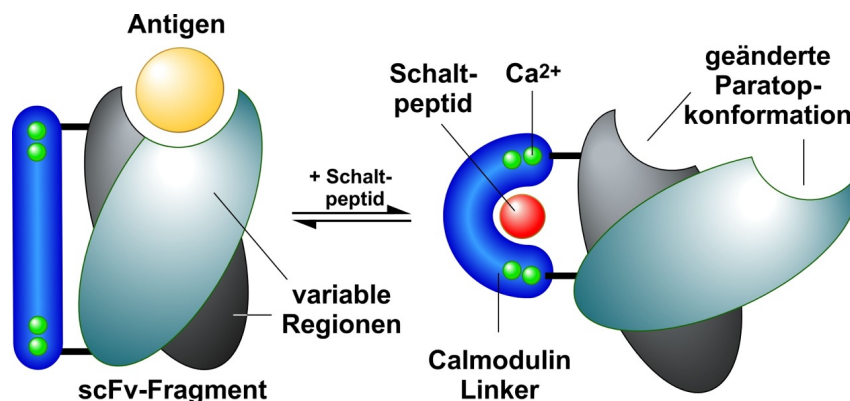


Abb. 2.5: Hypothetischer Mechanismus eines Calmodulin/M13-Peptid-basierten schaltbaren scFv-Systems

Bei Bindung von M13-Peptid an Ca^{2+} -Calmodulin könnte es zu einer allosterischen Beeinflussung der Paratopkonformation des scFvs führen, wodurch die Affinität des Antikörperfragments zum Antigen moduliert werden sollte. Abkürzungen, V_H/V_L : variablen Region der schweren/leichten Kette.

3 Material

3.1 Chemikalien, Materialien und Software

3.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München), Invitrogen (Karlsruhe) und AppliChem (Darmstadt) bezogen.

3.1.2 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Pierce™ Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate	Merck Millipore (Darmstadt)
Invisorb® Spin Plasmid Mini Two	Stratec Molecular (Berlin)
NucleoBond® PC 100	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoBond® Xtra Maxi EF	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel (Düren)

3.1.3 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
2-Log DNA Ladder	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare (Solingen)
Amicon® Ultra Zentrifugen-Filtereinheiten	Merck Millipore (Darmstadt)
Desoxyribonukleosidtriphosphate	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Dialyseschlauch Visking	Roth (Karlsruhe)
DryEase® Mini-Gel Cellophane	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)

3 MATERIAL

Bezeichnung	Hersteller
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad (München)
Entwicklerlösung	Tetenal (Norderstedt)
Fixiererlösung	Tetenal (Norderstedt)
Gel Filtration Standard (1,35 – 670 kDa)	Bio-Rad (München)
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Immun-Blot™ PVDF-Membrane	Bio-Rad (München)
MTP (Polypropylen), U- bzw. V-Boden	Greiner Bio-One (Solingen)
Nickel Sepharose™ 6 Fast Flow	GE Healthcare (Solingen)
Nunc Maxisorp® ELISA Platten	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Oligonukleotide	Metabion (Planegg/Steinkirchen)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
PCR-Mikroreaktionsgefäße (0,2 mL)	Eppendorf (Hamburg)
Poly-Prep® Chromatography Columns	Bio-Rad (München)
Mikroreaktionsgefäße (1,5 mL/2 mL)	Starlab (Hamburg)
Reaktionsgefäße (15 mL/50 mL)	BD Biosciences (Heidelberg)
SOC-Medium	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
Superdex™ 200, Prep Grade	GE Healthcare (Solingen)
TMB-Substratlösung	Seramun Diagnostica (Heidesee)
Tris-Glycin-Gele (4–20 %)	Anamed (Bad Ems)
Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer (10×)	Anamed (Bad Ems)
Yarra SEC-3000	Phenomenex (Aschaffenburg)

3.1.4 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Blot-Apparatur	Fast Blot B34	Biometra (Göttingen)
Chromatographieanlagen	Agilent 1100 HPLC	Agilent Technologies (Ratingen)
	ÄKTA-Purifier	GE Healthcare (Solingen)
Geltrocknungsrahmen	DryEase® Mini-Gel Drying	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
	Frame	
Durchflusszytometer	MACSQuant® Analyzer 10	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Elektroporator	GenePulser® II	Bio-Rad (München)
ELISA-Reader	Versamax® ELISA Microplate	Molecular Devices (Sunnyvale, USA)
	Reader	

3 MATERIAL

Gerät	Typ	Hersteller
ELISA-Washer	HydroFlex™ Microplate Washer	Tecan (Crailsheim)
Geldokumentation	Geldoc 1000	Bio-Rad (München)
	Geldoc 2000	Bio-Rad (München)
Gelelektrophoresekammern für Agarosegele	Horizon® 11.14	Biometra (Göttingen)
	Horizon® 58	Biometra (Göttingen)
Gelelektrophoresekammer für SDS-PAGE	XCell SureLock® Mini-Cell	Invitrogen (Karlsruhe)
Heizblock	ThermoMixer® comfort	Eppendorf (Hamburg)
Inkubatoren	Brutschrank zur Anzucht von <i>E. coli</i>	Heraeus (Hanau)
Magnetrührer	IKA RH basic 2	IKA (Staufen)
Massenspektrometer	micrOTOF-Q	Bruker Daltonics (Bremen)
MTP-Schüttelinkubator	VorTemp™ 56	Labnet (Edison, USA)
pH-Meter	pH-Meter 765	Knick (Berlin)
Pipetten	Research Plus 10 µL	Eppendorf (Hamburg)
	Research Plus 100 µL	Eppendorf (Hamburg)
	Research Plus 1000 µL	Eppendorf (Hamburg)
	Research Plus 8x100 µL	Eppendorf (Hamburg)
	Research Plus 8x300 µL	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe	Accu-jet®	Brand (Wertheim)
Reinstwasseranlage	Milli-Q® Synthesis A10	Merck Millipore (Darmstadt)
Schüttelinkubatoren	Ecotron	Infors HT (Einsbach)
	Thermo Forma Orbital Shaker	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Spektrophotometer	NanoDrop® 1000	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
	SmartSpec™ 3000	Bio-Rad (München)
Sterilwerkbänke	Herasafe™	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
	Herasafe KSP™	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Thermocycler	Mastercycler® Gradient	Eppendorf (Hamburg)
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)

3 MATERIAL

Gerät	Typ	Hersteller
Waagen	CP224 S	Sartorius (Göttingen)
	Kern KB 500-2	Kern (Balingen)
	Kern EW 6000-1M	Kern (Balingen)
Zentrifugen	5415R	Eppendorf (Hamburg)
	5424	Eppendorf (Hamburg)
	Heraeus Multifuge® 3SR+	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
	Heraeus Multifuge® 4KR	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)

3.1.5 Software, Online-Tools, Datenbanken

Software/Tool/Datenbank	Funktion	Quelle
Clone Manager 9	Sequenzbearbeitung	Scientific and Educational Software (USA)
ExPASy Bioinformatics Resource Portal	Bestimmung von Proteinparametern	http://web.expasy.org/protparam/
Graphic Converter 9	Bildbearbeitung	Lemke Software (Peine)
GraphPad Prism® 7 für Mac	Datenverarbeitung, Graphikerzeugung	GraphPad Software (USA)
ImageJ 1.49v	Proteinquantifizierung	Wayne Rasband, National Institutes of Health (USA)
MACSQuantify™	Analyse durchflusszytometrischer Daten	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Mendeley Desktop 1.16.1 für Mac	Literaturverwaltung	Elsevier (NL)
Microsoft® Office 2011/2016 für Mac	Tabellenkalkulation, Textverarbeitung	Microsoft Corporation (USA)
NanoDrop® 1000 Software	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Adobe Photoshop CC 2015.5	Bildbearbeitung	Adobe Systems (USA)
PSI Structural Biology Knowledgebase	Datenbank für Proteinstrukturmodelle	http://sbkb.org/
PyMOL	Protein-Modelling	https://www.pymol.org
Quantity One®	Geldokumentation	Bio-Rad (München)

3 MATERIAL

Software/Tool/Datenbank	Funktion	Quelle
RCSB Protein Data Bank	Datenbank für Proteinstrukturmodelle	http://www.rcsb.org/
SoftMax® Pro 6	Erfassung und Auswertung von Mikrotiterplattendaten	Molecular Devices (Sunnyvale, USA)

3.2 Puffer und Lösungen

Alle aufgeführten Puffer und Lösungen sowie deren Komponenten wurden, soweit nicht anders vermerkt, mit Reinstwasser hergestellt.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
1× B-TBS (ELISA)	1 % (w/v) BSA in TBS
1× B-TBS (MACSQuant)	0,5 % (w/v) BSA in TBS
CaCl ₂ -Stammlösung	1 M CaCl ₂ × 2 H ₂ O
Coomassieentfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure
Coomassiefärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure; 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G250
Ethidiumbromidlösung	10 g L ⁻¹ Ethidiumbromid
Geltrocknungslösung	22 % (v/v) Ethanol; 2 % (v/v) Glycerin; 1 % (v/v) Isopropanol
5× Laemmli-Laufpuffer	100 g L ⁻¹ SDS; 250 mL L ⁻¹ 1 M Tris-HCl (pH 6,8); 40 % (w/v) Glycerin; 0,025 % (w/v) Bromphenolblau
5× Laemmli-Laufpuffer (reduzierend)	3,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol in 5× Laemmli-Laufpuffer
NS6 Waschpuffer 1	50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 50 mM NaCl; 5 mM Imidazol; pH 7,4/pH 9,0
NS6 Waschpuffer 2	50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 50 mM NaCl; 25 mM Imidazol; pH 7,4/pH 9,0
NS6 Elutionspuffer 1	50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 50 mM NaCl; 150 mM Imidazol; pH 7,4/pH 9,0
NS6 Elutionspuffer 2	50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 50 mM NaCl; 350 mM Imidazol; pH 7,4/pH 9,0
NS6 Elutionspuffer 3	50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 50 mM NaCl; 500 mM Imidazol; pH 7,4/pH 9,0
NS6 11× Puffer	110 mM Tris; 550 mM NaCl; 55 mM Imidazol; pH 7,4/pH 9,0
1× PBS	137 mM NaCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 3,7 mM KCl; 2 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4

3 MATERIAL

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
50× TAE	2 M Tris; 1 M Essigsäure; 50 mM EDTA
TBF1	10 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$; 30 mM Kaliumacetat; 100 mM RbCl ; 50 mM $\text{MnCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$; 2,25 % (w/v) Glycerin; pH 5,8 (mit Essigsäure eingestellt)
TBF2	10 mM MOPS; 10 mM RbCl ; 75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$; 2,25 % (w/v) Glycerin; pH 8,0 (mit KOH eingestellt)
1× TBS	50 mM Tris; 150 mM NaCl ; pH 7,0/pH 7,4/pH 8,0
1× TBS-T (ELISA)	0,05 % (v/v) Tween20 in TBS
1× TBS-T (Western Blot)	0,1 % (v/v) Tween20 in TBS
TE-Puffer (für PPP)	100 mM Tris; 10 mM EDTA; pH 7,4/pH 9,0
10× Transferpuffer	480 mM Tris; 390 mM Glycin; 13 mM SDS
1× Transferpuffer	10 % (v/v) Methanol in 1× Transferpuffer

3.3 Nährmedien zur Anzucht von Mikroorganismen

Alle aufgeführten Medien und Supplemente sowie deren Komponenten wurden, soweit nicht anders vermerkt, mit deionisiertem Wasser hergestellt.

Medium/Supplement	Zusammensetzung
2× YP-Agar	2× YP-Flüssigmedium mit 15 g L^{-1} Agar
2× YP-Flüssigmedium	16 g L^{-1} Sojapepton; 10 g L^{-1} Hefeextrakt; 5 g L^{-1} NaCl ; pH 7,0
2× YP-A	2× YP-Flüssigmedium mit 100 mg L^{-1} Ampicillin
2× YP-GA	2× YP-Flüssigmedium mit 100 mM Glucose und 100 mg L^{-1} Ampicillin
2× YP-K	2× YP-Flüssigmedium mit 50 mg L^{-1} Kanamycin
2× YP-GK	2× YP-Flüssigmedium mit 100 mM Glucose und 50 mg L^{-1} Kanamycin
Ampicillin-Stammlösung (1000×)	100 g L^{-1} Ampicillin-Natriumsalz
Glucose-Stammlösung (20×)	2 M Glucosemonohydrat
IPTG-Stammlösung	1 M IPTG
Kanamycin-Stammlösung (1000×)	50 g L^{-1} Kanamycinsulfat

3.4 Mikroorganismen, Plasmide und Oligonukleotide

3.4.1 Mikroorganismen

Stamm	Charakteristika
<i>E. coli</i> NEB® 5-alpha	<i>F</i> ⁻ Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁻ <i>m_k</i> ⁺) <i>supE44</i> λ - <i>thi-1</i> <i>gyrA relA1</i>
<i>E. coli</i> Veggie Nova Blue Singles	<i>endA1 hsdR17</i> (<i>r_{k12}</i> ⁻ <i>m_{k12}</i> ⁺) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lacF'</i> [<i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Z Δ M15::Tn10] (<i>Tet</i> ^R)
<i>E. coli</i> W3110	<i>F</i> ⁻ λ ⁻ <i>rph-1 INV(rrnD, rrnE)</i>

3.4.2 Plasmide

Plasmid	Charakteristika
pJ201-4M5.3 scFv	Transfektor von DNA2.0, Quelle für α FITC scFv-Gen (abgeleitet von Klon 4M5.3) (Boder <i>et al.</i> , 2000)
pJ201-aBiotin scFv	Transfektor von DNA2.0, Quelle für α Biotin scFv-Gen (abgeleitet von Klon Bio3-18E7.2) (Miltenyi Biotec)
pJ201-CaM	Transfektor von DNA2.0, Quelle für Calmodulin-Gen
pJ201-CD4 scFv	Transfektor von DNA2.0, Quelle für α CD4 scFv-Gen (abgeleitet von Klon Q425) (Healey <i>et al.</i> , 1990)
pJ201-CD14 scFv	Transfektor von DNA2.0, Quelle für α CD14 scFv-Gen (abgeleitet von Klon TÜK4) (Goyert & Ferrero, 1987)
pJ201-CD20 scFv	Transfektor von DNA2.0, Quelle für α CD20 scFv-Gen (abgeleitet von Klon LT20) (Polyak & Deans, 2002)
pJ201-D1.3 scFv	Transfektor von DNA2.0, Quelle für α Lysozym scFv-Gen (abgeleitet von Klon D1.3) (Mariuzza <i>et al.</i> , 1983)
pOPE313 scFv HH	Vektor zur periplasmatischen Expression von scFvs

3.4.3 Oligonukleotide zur Sequenzierung und Kolonie-PCR

Eine vollständige Liste der Oligonukleotide zur Erzeugung permutierter Calmodulin-Varianten befindet sich im Anhang (vgl. 8.4).

Oligoname	Sequenz (5'→3')
pOPE201_f3	GTGTTACAACCAATTAACCAATTC

3 MATERIAL

Oligoname	Sequenz (5'→3')
pOPE_rev2	GTGATCATTAGCACAGGCC
pOPE_rev3	CGTTAACCGACAAACAACAG
D1.3 scFv VH_fwd	TGCGCGTGAACGCGACTATC
D1.3 scFv VL_rev	AGGTGATCGTCACGGTTTCG

3.5 Enzyme, Antikörper, Reagenzien zur durchflusszytometrischen Analyse und Peptide

3.5.1 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Alkalische Phosphatase (rSAP)	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
Benzonase® Nuclease	Merck (Darmstadt)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
REDTaq® DNA-Polymerase	Sigma-Aldrich (München)
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)

3.5.2 Antikörper und Reagenzien zur durchflusszytometrischen Analyse

Bezeichnung	Hersteller
αBiotin-PE (Klon: Bio3-18E7)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
αCD4-PE (Klon: M-T466)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
αCD14-Biotin (Klon: TÜK4)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
αCD14-FITC (Klon: TÜK4)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
αCD14-PE (Klon: TÜK4)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
αCD20-PE (Klon: LT20)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
αHis-APC (Klon: GG11-8F3.5.1)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
αHis-FITC (Klon: GG11-8F3.5.1)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
αHis-HRP (Klon: GG11-6F4.3.2)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
αHis-PE (Klon: GG11-8F3.5.1)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
FcR-Blocking Reagent	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
MACSQuant® Running Buffer	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
MACSQuant® Storage Solution	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

3 MATERIAL

Bezeichnung	Hersteller
MACSQuant® Washing Solution	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Propidium iodide solution	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Reopro® (Abciximab)	Lilly (Gießen)

3.5.3 Peptide

M13-Peptid, L (pur) wurde von Anaspec (Fremont, USA) bezogen. Alle weiteren Peptide wurden von Genscript (Piscataway, USA) bezogen. Alle M13-Varianten wurden von skMLCK (*skeletal muscle myosin light chain kinase*) abgeleitet.

M13-Peptid-Varianten

Peptid	Sequenz (N'→ C')	Referenz
M13-Peptid, L (pur)	KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL	Blumenthal <i>et al.</i> , 1985
M13-Peptid, S	KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGA	mod. nach Blumenthal <i>et al.</i> , 1985
M13-Peptid, XS	RWKKNFIAVSAANRFKKIS	Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var2	WKKNFIAVSAANRFKKIS	Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var3	RWKKNFIAVSAANRFKKI	Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var4	RWKKNFIAVSAANRFKK	Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var5	RWKKAFIAVSAANRFKKIS	Montigiani <i>et al.</i> , 1996
M13-Var6	WKKAFAVSAANRFKKIS	Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var7	RWKKAFIAVSAANRFKKI	Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var8	RWKKAFIAVSAANRFKK	Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var9	RWKKNI IAVSAANRFKKIS	Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var10	RWKKNF IKVSAANRFKKIS	Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var11	RWKKNFIAVLAAANRFKKIS	Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var12	RWKKNFIAVSAINRFKKIS	Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var13	RWKKAI I KVLAINRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var14	RWKKAI I KVLAAANRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var15	RWKKAI I KVSAAANRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var16	RWKKAI IAVSAANRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var17	RWKKAFIKVLAINRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var18	RWKKAFIAVLAINRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var19	RWKKAFIAVSAINRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var20	RWKKNI I KVLAINRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var21	RWKKNF I KVLAINRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004

3 MATERIAL

Peptid	Sequenz (N'→ C')	Referenz
M13-Var22	RWKKNFIAVLAINRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var23	RWKKAI IKVSAINRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var24	RWKKAI IAVSAINRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var25	RWKKAI IAVLAINRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var26	RWKKAFIKVSAANRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var27	RWKKAFIAVLAANRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var28	RWKKAI IAVLAANRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var29	RWKKAFIKVLAANRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var30	RWKKAFIKVSAINRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var31	RWKKNI IKVLAANRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var32	RWKKNI IKVSAANRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var33	RWKKNI IAVLAINRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var34	RWKKNI IAVLAANRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var35	RWKKNI IAVSAINRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var36	RWKKNDIAVSAANRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var37	RWKKNFIDVSAANRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var38	RWKKNFIAVHAANRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004
M13-Var39	RWKKNFIAVSARNRFKKIS	mod. nach Hultschig <i>et al.</i> , 2004

Weitere Calmodulin-Bindepeptide

Peptid	Sequenz (N'→ C')	abgeleitet von (Referenz)
CBP-Var2	GVRNIKSMWEKGNVFSS	Caldesmon (Zhang & Vogel, 1994)
CBP-Var3	ARRKLKAAVKAVVASSRLGS	Calspermin (Ono <i>et al.</i> , 1989)
CBP-Var4	FMNNWEVYKLLAHIRPPAPKSGSYT	PFK (Buschmeier <i>et al.</i> , 1987)
CBP-Var5	ARKEVIRNKIRAIGKMARVFSVLR	Calcineurin (Kincaid <i>et al.</i> , 1988)
CBP-Var6	RGQILWFRGLNRIQTQIKVNAFS	Ca ²⁺ -ATPase (James <i>et al.</i> , 1988)
CBP-Var7	RRKHLQRPIFRLRCLVKQLEK	PDE (Novack <i>et al.</i> , 1991)
CBP-Var8	KTASPWKSARLMVHTVATFNSIKE	α-Spektrin (Leto <i>et al.</i> , 1989)
CBP-Var9	KKKKKRFSFKKSFKLSGFSFKKSKK	MARCKS (Graff <i>et al.</i> , 1991)
CBP-Var10	KKKATFRAITSTLASSFKRRSSK	NMDA-Rezeptor (Ehlers <i>et al.</i> , 1996)
CBP-Var11	KRRAIGFKKLAEAVKFSAKLMGQ	cNOS (Zhang <i>et al.</i> , 1995)
CBP-Var12	RKKTFKEVANAVKISASLMG	eNOS (Matsubara <i>et al.</i> , 1996)
CBP-Var13	AAARKEVIRNKIRAIGKMARVFSVL	Calcineurin (Kincaid <i>et al.</i> , 1988)
CBP-Var14	KIQASFRGHMARKKIKSGE	Neurogranin (Baudier <i>et al.</i> , 1991)
CBP-Var15	KAATKIQASFRGHITRKKLKGEKKG	Neuromodulin (Apel <i>et al.</i> , 1990)
CBP-Var16	LRRGQILWFRGLNRIQTQIK	Ca ²⁺ -ATPase (James <i>et al.</i> , 1988)
CBP-Var17	SKYITTIAGVMTLSQVKGFVRKNGV	CD95 (Cao <i>et al.</i> , 2014)
CBP-Var18	ATLDALLAALRRIQRAD	p75 ^{NTR} (Cao <i>et al.</i> , 2014)

3 MATERIAL

Peptid	Sequenz (N'→ C')	abgeleitet von (Referenz)
CBP-Var19	RAANLWPSPLMIKRSKNS	Estrogenrezeptor α (Zhang <i>et al.</i> , 2012)
CBP-Var20	KIYAAMMIMEYYRQSKAKKLQ	VDCC, P/Q-Typ (Mori <i>et al.</i> , 2008)
CBP-Var21	KIYAAMMIMDYYKQSKVKKQR	VDCC, R-Typ (Mori <i>et al.</i> , 2008)
CBP-Var22	KFYATFLIQEHFRKFMKRQEE	VDCC, L-Typ (Halling <i>et al.</i> , 2009)
CBP-Var23	GTGAALSWQAAIDAARQAKLMGSA	VDCC, L-Typ (Liu & Vogel, 2012)
CBP-Var24	HMGKVYAALMIFDFYKQNKTSRD	VDCC, N-Typ (Kim <i>et al.</i> , 2008)
CBP-Var25	GHMGKIYAAMMIMDYYKQSKVKK	VDCC, R-Typ (Kim <i>et al.</i> , 2008)
CBP-Var26	HMGKIYAAMMIMEYYRQSKAKK	VDCC, P/Q-Typ (Kim <i>et al.</i> , 2008)
CBP-Var27	IKKNFAKSKWKQAFNATAVVRHMRK	CaMKI (Clapperton <i>et al.</i> , 2002)
CBP-Var28	LKKFNARRKLKGAILTTMLATRNFS	CaMKII (Meador <i>et al.</i> , 1993)
CBP-Var29	HSMQALSWRKLYLSRAKLKA	Orai1 (Liu <i>et al.</i> , 2012)
CBP-Var30	AKSKWKQAFNATAVVRHMRKLQ	CaMKI (Yuan <i>et al.</i> , 1998)

4 Methoden

Ein Teil der aufgeführten Methoden wurde aus einer vorhergehenden Prüfungsarbeit entnommen.

Kellmann, S. (2012). Erzeugung von *Escherichia coli*-Mutanten zur sekretorischen Produktion von rekombinanten Antikörperfragmenten. Masterarbeit, Ruhr-Universität Bochum.

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Methoden zur DNA-Isolierung

4.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte, je nach erforderlichem Maßstab, mithilfe diverser Kits (High Pure Plasmid Isolation Kit, Invisorb® Spin Plasmid Mini Two, NucleoBond® PC 100, NucleoBond® Xtra Maxi EF) nach den Angaben des jeweiligen Herstellers.

4.1.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration gereinigter DNA wurde mithilfe eines Spektrophotometers (NanoDrop®1000) mit dazugehöriger Software bestimmt.

4.1.2 Amplifikation von DNA

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis *et al.*, 1986). Hierzu wurden jeweils spezifische, komplementäre Oligonukleotide benötigt, die die flankierenden Regionen des zu amplifizierenden DNA-Fragments binden.

4.1.2.1 Erzeugung permutierter Calmodulin-Varianten

Permutierte Calmodulin-Varianten wurden mittels PCR generiert. Die verwendeten Oligonukleotide wurden so konstruiert, dass insgesamt alle 152 möglichen Varianten mithilfe des zirkularisierten *CaM*-Fragments (vgl. 4.1.5.3) als Template erzeugt werden konnten. Restriktionsschnittstellen wurden über die Überhänge der Oligonukleotide angefügt. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze und des verwendeten PCR-Programms sind in Tab. 4.1 und Tab. 4.2 zusammengefasst.

4 METHODEN

Tab. 4.1: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes zur Erzeugung permutierter Calmodulin-Varianten

Komponente	Volumen [μL]
CaM; zirkularisiert (1 ng/ μL)	0,32
Phusion™-Reaktionspuffer (5 \times)	3,2
dNTPs (10 mM each)	0,32
Forward-Oligonukleotid (10 μM)	0,8
Reverse-Oligonukleotid (10 μM)	0,8
Phusion™-DNA-Polymerase (2 U/ μL)	0,16
rH ₂ O	10,4

Tab. 4.2: PCR-Programm zur Erzeugung permutierter Calmodulin-Varianten

Schritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [s]	
Initiale Denaturierung	98	60	
Denaturierung	98	10	} 30x
Annealing	T _A	20	
Elongation	72	15	
Finale Elongation	72	600	
Lagerung	4	∞	

4.1.2.2 Kolonie-PCR

Die Identifizierung positiver Klone (d.h. Transformanten, die einen Vektor mit Insert der richtigen Größe besitzen) erfolgte alternativ zur Isolierung von Plasmid-DNA und Restriktionsanalyse (vgl. 4.1.5.1) mittels Kolonie-PCR.

Dazu wurden jeweils 16 μL PCR-Ansatz (Tab. 4.3) in ein PCR-Mikroreaktionsgefäß vorgelegt, im Anschluss Kolonien von der zu untersuchenden Agarplatte mit einer Pipettenspitze gepickt, auf eine neue Kontrollplatte überführt und im Anschluss im PCR-Ansatz resuspendiert. Positive Klone wurden über gelelektrophoretische Auswertung der PCR identifiziert.

Tab. 4.3: Zusammensetzung eines Kolonie-PCR-Ansatzes

Komponente	Volumen [μL]
RedTaq®-Reaktionspuffer (10 \times)	1,6
dNTPs (10 mM each)	0,32
Forward-Oligonukleotid (10 μM)	0,64
Reverse-Oligonukleotid (10 μM)	0,64
RedTaq®-DNA-Polymerase (1 U/ μL)	0,32
rH ₂ O	12,48

Tab. 4.4: Programm für Kolonie-PCR

Schritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [s]	
Initiale Denaturierung	94	300	
Denaturierung	94	60	} 30x
Annealing	T _A	45	
Elongation	72	60	
Finale Elongation	72	600	
Lagerung	4	∞	

4 METHODEN

4.1.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Mittels Gelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente ihrer Größe nach auftrennen. Als Größenstandard wurde 2-Log DNA Ladder verwendet. Zur Auftrennung der Fragmente wurden 1 %-Agarosegele (Ausnahme: 1,8 %-Agarosegele bei Isolierung von zirkularisiertem *CaM*-Fragment) verwendet. Dazu wurde 1× TAE-Puffer zu Agarose hinzugefügt, kurz aufgekocht, mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 1 µg/mL) versetzt und in einen Gelträger mit passendem Probenkamm gegossen. Nach Aushärten des Gels wurde dies in eine mit 1× TAE-Puffer gefüllte Gelkammer überführt und mit den Proben, die zuvor mit 6× Probenpuffer versetzt wurden, beladen. Der Lauf des Gels erfolgte für 1 bis 2 h bei einer Spannung von 50 bis 100 V. Die Auswertung erfolgte mithilfe eines UV-Transilluminators.

4.1.4 Reinigung von DNA

Die Reinigung von DNA nach Restriktion oder Amplifikation mittels PCR erfolgte über das NucleoSpin® Gel and PCR clean-up Kit nach den Angaben des Herstellers.

4.1.5 Methoden zur DNA-Modifikation und Klonierung

4.1.5.1 Restriktion von DNA mithilfe von Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen und schneiden spezifische DNA-Sequenzen. Dabei entstehen offene Enden, welche sich bei Komplementarität mittels Ligation wieder zusammenfügen lassen. Im Rahmen der verschiedenen Klonierungen wurden diverse Restriktionsspaltungen durchgeführt. Präparative Ansätze wurden dabei in einem Volumen von 50 µL und analytische Ansätze (Testrestriktionen) in einem Volumen von 15 µL durchgeführt, deren genaue Zusammensetzung in Tab. 4.5 exemplarisch aufgeführt ist. Der Verdau erfolgte bei 37 °C für 1 bis 3 h. Präparative Ansätze wurden nach dem Verdau über Gelextraktion gereinigt und weiterverarbeitet. Analytische Ansätze wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und unter UV-Licht ausgewertet.

Tab. 4.5: Typischer präparativer und analytischer Restriktionsverdau

<i>Komponente</i>	<i>Präparativer Ansatz Volumen [µL]</i>	<i>Analytischer Ansatz Volumen [µL]</i>
Vektor	< 43 (2–5 µg)	< 12,5 (1 µg)
Reaktionspuffer (10×)	5	1,5
Enzym (10 U/µL)	je 1	je 0,5
rH ₂ O	ad 50	ad 15

4.1.5.2 Dephosphorylierung linearer Plasmid-DNA

Dephosphorylierung linearer Plasmid-DNA verhindert im Anschluss an eine Restriktionsspaltung die Religation des Vektors. Nach Restriktion, elektrophoretischer Auftrennung und Aufreinigung

4 METHODEN

des Vektorrückgrates erfolgte die Behandlung mit alkalischer Phosphatase (*shrimp alkaline phosphatase*, SAP) mit dazugehörigem Puffer über einen Zeitraum von 30 bis 60 min bei 37 °C. Ein typischer Reaktionsansatz ist in Tab. 4.6 aufgeführt. Nach Inaktivierung des Enzyms (5 min, 65 °C) wurde der dephosphorylierte Vektor direkt zur Ligation eingesetzt.

Tab. 4.6: Ansatz zur Dephosphorylierung linearer Plasmid-DNA

Komponente	Volumen [μ L]
restringierter Vektor (2 μ g)	< 34
SAP-Puffer (10 \times)	4
SAP (1 U/ μ L)	2
rH ₂ O	ad 40

4.1.5.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligasen sind Enzyme, welche zuvor geschnittene DNA bei Komplementarität der offenen Enden wieder zusammenfügen können. Nach Verdau von DNA-Insert und Vektor erfolgte bei präparativen Ansätzen im Anschluss die Ligation. Bei Standardklonierungen wurden meistens 50 ng Vektor-DNA eingesetzt, wobei die Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 oder 1:5 (Vektor : Insert) eingesetzt wurde. Die jeweils benötigten DNA-Mengen berechneten sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Menge Vektor [ng]} \times \text{Größe Insert [bp]}}{\text{Größe Vektor [bp]}} \times \text{molares Verhältnis} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = \text{Menge Insert [ng]} \quad (4.1)$$

Die Zirkularisierung von linearem *CaM*-Fragment erfolgte ebenfalls mithilfe der T4-DNA-Ligase, wobei eine DNA-Konzentration von 2,5 ng/ μ L nicht überschritten wurde, um die Bildung von Multimeren zu verhindern. Typische Ligations- und Zirkularisierungsansätze sind in Tab. 4.7 und Tab. 4.8 aufgeführt. Die Ligation wurde üN bei 16 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 65 °C für 10 min. Im Anschluss wurden Ligationsansätze für Standardklonierungen direkt zur Transformation von *E. coli* verwendet, wohingegen zirkularisiertes *CaM*-Fragment mittels Gelelektrophorese isoliert wurde.

Tab. 4.7: Ligationsansatz

Komponente	Volumen [μ L]
Vektor-DNA (50 ng)	< 5
Insert-DNA (1:3, 1:5)	< 7,5
Ligase-Puffer (10 \times)	1,5
T4-DNA-Ligase (400 U/ μ L)	1
rH ₂ O	ad 15

4 METHODEN

Tab. 4.8: Zirkularisierungsansatz

Komponente	Volumen [μL]
CaM; linear (1000 ng)	< 358
Ligase-Puffer (10 \times)	40
T4-DNA-Ligase (400 U/ μL)	2
rH ₂ O	ad 400

4.1.5.4 Sequenzierung von PCR-Fragmenten und Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von gereinigten PCR-Fragmenten und Plasmid-DNA erfolgte mit spezifischen Oligonukleotiden und wurde vom Sequenzierservice der GATC Biotech AG (Köln) durchgeführt.

4.2 Mikrobiologische Methoden

4.2.1 Methoden zur Kultivierung verschiedener *E. coli*-Stämme

Zur Kultivierung verschiedener *E. coli*-Stämme wurde 2 \times YP-Medium verwendet. Die Bakterien wurden aerob entweder in Flüssigkultur im Schüttelinkubator oder auf Agarplatten bei 37 °C kultiviert. Für die Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 15 g Agar pro L Medium vor dem Autoklavieren zugegeben. Zur selektiven Anzucht von *E. coli*-Zellen wurde dem Medium nach dem Autoklavieren Antibiotikum zugesetzt.

4.2.2 Konservierung von *E. coli*-Stämmen

Zur Konservierung von *E. coli*-Kulturen wurden Glycerinkulturen angelegt. Glycerin verhindert durch seine entwässernde Wirkung beim Gefrieren der Zellen die Eiskristallbildung und folglich die Zerstörung der Zellen. Dazu wurden 700 μL einer Übernachtskultur mit 300 μL 50 % (v/v) Glycerin in einem Kryoröhrchen vermischt (final 15 % Glycerin) und im Anschluss bei –70 °C gelagert.

4.2.3 Erzeugung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Die Erzeugung chemokompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte mithilfe der Calciumchlorid-Methode. Es wurden 100 mL 2 \times YP-Medium mit 1 mL einer Übernachtskultur angeimpft und im Schüttelinkubator bei 250 rpm und 37 °C kultiviert, bis eine OD₆₀₀ zwischen 0,4 und 0,7 erreicht wurde. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet (2000 g, 10 min, 4 °C) und das gewonnene Pellet in 30 mL eiskaltem TBF1 resuspendiert. Nach 90-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut zentrifugiert (2000 g, 10 min, 4 °C). Das gewonnene Pellet wurde in 4 mL eiskaltem TBF2 aufgenommen, in 100 μL -Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –70 °C gelagert.

4 METHODEN

4.2.4 Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen (Hanahan, 1983)

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme freier DNA durch kompetente Bakterien. Pro Ansatz wurden 25 µL chemokompetente *E. coli*-Zellen mit 5 µL Ligationsansatz oder einer bestimmten DNA-Menge (1 bis 100 ng) vermischt. Danach wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock für 30 s (*E. coli* NEB® 5-alpha, *E. coli* Veggie Nova Blue Singles) bzw. 60 s (*E. coli* W3110) bei 42 °C. Daraufhin wurde der Ansatz für weitere 2–5 min auf Eis gestellt und im Anschluss nach Zugabe von 0,5 mL SOC-Medium für 60 min bei 37 °C und 750 rpm im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Mengen des Ansatzes auf 2× YP-Agarplatten mit Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C üN inkubiert. Erfolgreich transformierte Bakterien wurden durch Antibiotikaresistenz selektiert.

4.2.5 Produktion von scFv-Fragmenten im MTP-Maßstab

Erste Einzelklonanalysen und Funktionalitätstests von scFv-Fragmenten erfolgten im MTP-Maßstab. Eine Mikrotiterplatte (PP, U-Boden) wurde mit 180 µL 2× YP-GK-Medium pro Vertiefung befüllt, mit erfolgreich transformierten *E. coli*-Zellen, die das Zielkonstrukt beinhalten, beimpft und üN bei 30 °C und 1000 rpm im MTP-Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine frische Platte (170 µL 2× YP-GK-Medium pro Vertiefung) mit jeweils 5 µL der Übernachtskulturen beimpft und bei 30 °C für 6 h bei 1000 rpm inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 0,2 mM IPTG (finale Konzentration) und die Produktion der scFv-Fragmente erfolgte bei 25 °C üN bei 1000 rpm. Nach Zentrifugation der Kulturen (4000 g, 20 min, RT) wurden die Zellpellets bei –20 °C gelagert oder direkt weiter prozessiert (vgl. 4.3.1.1).

4.2.6 Produktion von scFv-Fragmenten im Schüttelkolbenmaßstab

Zur weiteren Charakterisierung gereinigter scFv-Fragmente erfolgte die Produktion im Schüttelkolbenmaßstab. Pro Konstrukt wurden 30 mL 2× YP-GK-Medium aus der dazugehörigen Glycerinkultur angeimpft und üN bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden 500 mL frisches Medium mithilfe der Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und inkubiert (37 °C, 250 rpm), bis eine OD₆₀₀ von 1,0 erreicht wurde. Die Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 0,2 mM IPTG (finale Konzentration). Die Produktion der scFv-Fragmente erfolgte für 4 h bei 25 °C. Nach Zentrifugation der Kulturen (4000 g, 20 min, 4 °C) wurden die Zellpellets bei –20 °C gelagert oder direkt weiter prozessiert (vgl. 4.3.1.2).

4.3 Biochemische Methoden

4.3.1 Isolierung von scFv-Fragmenten aus dem Periplasma von *E. coli*

4.3.1.1 Periplasmapräparation von *E. coli* – MTP-Maßstab

Zur Charakterisierung der im MTP-Maßstab produzierten scFv-Fragmente erfolgte deren Isolierung aus dem Periplasma. Hierfür wurden die Zellpellets in 100 µL TE-Puffer (pH 7,4 oder pH 9,0; abhängig vom pI der scFv-Fragmente) resuspendiert und für 2 h bei 37 °C und 1000 rpm auf dem MTP-Schüttelinkubator inkubiert. Der scFv-haltige Überstand wurde durch Zentrifugation (4000 g, 20 min, RT) von den Zellen getrennt und mittels ELISA (vgl. 4.3.7) oder PBMC-Färbung (vgl. 4.4.1) analysiert.

4.3.1.2 Periplasmapräparation von *E. coli* – Schüttelkolbenmaßstab

Nach Produktion der scFv-Fragmente wurde das frische oder zuvor bei –20 °C gelagerte Zellpellet in 10 mL TE-Puffer (pH 7,4 oder pH 9,0; abhängig vom pI des scFv-Fragments) pro g Pellet resuspendiert und üN in einem passenden Schüttelkolben bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden MgCl₂ (finale Konzentration: 20 mM) und 1 U Benzonase® Nuclease pro mL Periplasmaextrakt zur Degradation vorhandener DNA zugegeben. Zur Verhinderung von proteolytischem Abbau wurde Halt™ Protease Inhibitor Cocktail zugegeben und der Ansatz für eine weitere Stunde bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Der scFv-haltige Überstand wurde durch Zentrifugation (5000 g, 20 min, RT) von den Zellen getrennt und durch Zugabe von NS6 11× Puffer (pH 7,4 oder pH 9,0; abhängig vom pI des scFv-Fragments) für die folgende Aufreinigung vorbereitet.

4.3.2 Aufreinigung von scFv-Fragmenten über Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung der scFv-Fragmente erfolgte über Nickel Sepharose™ 6 mithilfe des C-terminalen His-Tags der Proteine. Je nach isoelektrischem Punkt des scFv-Fragments wurden Puffer mit pH 7,4 oder pH 9,0 verwendet, wobei der pH des Puffers einen möglichst großen Unterschied zum pI aufweisen sollte, um eine Aggregation des Zielproteins zu vermeiden. 250 µL Nickel Sepharose™ 6 Säulenmaterial wurde in leere Chromatographie-Säulen (Poly-Prep® Chromatography Columns) überführt und mittels *gravity flow* mit 10 SV NS6 Waschpuffer 1 equilibriert. Im Anschluss erfolgte die Beladung der Säule mit scFv-haltigem Periplasmaextrakt. Danach wurden unspezifisch gebundene Proteine durch zwei Waschschrte (30 SV N6S Waschpuffer 1, gefolgt von 15 SV N6S Waschpuffer 2) entfernt. Die Elution erfolgte in drei Schritten (5 SV NS6 Elutionspuffer 1, 5 SV NS6 Elutionspuffer 2, 5 SV NS6 Elutionspuffer 3). Im Anschluss wurden scFv-haltige Fraktionen vereint, mit 10 mM EDTA versetzt und bei 4 °C für 2 h gegen 200 Volumen 1× TBS (pH 8,0) dialysiert, gefolgt von einer weiteren Dialyse gegen 200 Volumen frischen Puffer. Die finale Dialyse erfolgte üN bei 4 °C gegen 500 Volumen

4 METHODEN

1× TBS. Gegebenenfalls wurden die dialysierten Eluate über Amicon® Ultra Zentrifugeneinheiten nach Angaben des Herstellers konzentriert. Die Lagerung der Eluate erfolgte bei -20 °C.

4.3.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen über SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese). Die Bindung von SDS verleiht den Proteinen eine einheitlich negative Ladung, wodurch die Wanderungsgeschwindigkeit nur noch vom Molekulargewicht abhängt. Die Protein/SDS-Komplexe wandern im elektrischen Feld folglich in Richtung der Anode und werden über die Polyacrylamidmatrix ihrer Größe nach aufgetrennt (Laemmli, 1970). Es wurden Tris-Glycin-Fertiggele (4-20%) und Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer verwendet. Die Proteinproben wurden mit 5× SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert und im Anschluss auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurde PageRuler™ Prestained Protein Ladder verwendet. Der Gellauf erfolgte bei 200 V, 5 W und 30 mA pro Gel.

4.3.4 Färbung und Trocknung von Proteingelen

Die Färbung von Proteingelen erfolgte über Coomassie-Färbung. Das Gel wurde für 15 min in Coomassie-Färbelösung und anschließend zur Entfernung unspezifisch gebundenen Farbstoffs für mindestens 2 h in Entfärbelösung inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Trocknung der Gele mithilfe des DryEase® Mini-Gel-Trocknungssystems. Dazu wurden die Gele in Geltrocknungslösung überführt und nach 20 min mit ebenfalls in Trocknungslösung getränkten speziellen Zellophanfolien auf einen Trocknungsrahmen gespannt. Die Trocknung erfolgte üN.

4.3.5 Western Blot

Über einen Western Blot lassen sich Proteine mithilfe spezifischer Antikörper nachweisen. Dabei werden die Proteine vorerst über eine SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt und im Anschluss im elektrischen Feld auf eine Membran übertragen. Der Nachweis von Proteinen erfolgt mithilfe spezifischer Antikörper, die gegen bestimmte Epitope der Proteine gerichtet sind (Towbin *et al.*, 1979).

Nach Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE wurden diese auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Transfer erfolgte über das Semi-Dry-Verfahren. Dafür wurde eine zuvor mit Methanol aktivierte PVDF-Membran auf ein mit 1× Transferpuffer getränktes Blotpapier gelegt. Auf die PVDF-Membran wurde luftblasenfrei das Proteingel gelegt, welches mit einem getränkten Blotpapier bedeckt wurde. Der Proteintransfer erfolgte in einer Blotkammer bei 15 V, 2 W und 100 mA pro Blot. Nach dem Transfer wurde die Membran zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen in 50 mL 1× TBS-T mit 5 % Magermilchpulver für 1 h bei RT auf dem Schüttler oder üN bei 4 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe eines spezifischen

4 METHODEN

Primärantikörpers oder eines HRP-gekoppelten Direktantikörpers und eine Inkubation für 1 h bei RT. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für 5 min mit 1× TBS-T gewaschen. Danach erfolgte bei Nutzung eines spezifischen Primärantikörpers die Zugabe des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers in 1× TBS-T mit 5 % Magermilchpulver. Nach einstündiger Inkubation wurde die Membran erneut dreimal gewaschen. Die Chemilumineszenzdetektion erfolgte mithilfe des Immobilon™ HRP Substrates nach Angaben des Herstellers. Danach wurde der Blot in der Dunkelkammer durch Auflegen eines Films (1 bis 60 min) und anschließendes Schwenken des Films in Entwickler- und Fixierlösung entwickelt.

4.3.6 Methoden zur quantitativen Proteinbestimmung

4.3.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels SDS-PAGE

Eine erste Abschätzung der Proteinkonzentration von gereinigten scFv-Fragmenten erfolgte über SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung. Als Standard wurde ReoPro® verwendet. Die Abschätzung erfolgte optisch und mithilfe des PC-Programms ImageJ.

4.3.6.2 Bradford-Assay

Essentieller Bestandteil dieser Methode ist das Bradfordreagenz, wobei es sich um den Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250 handelt. Dieser Farbstoff besitzt die Eigenschaft, sich an bestimmte Aminosäureseitenketten anzulagern und somit Komplexe mit Proteinen zu bilden. Bei Bindung des Farbstoffs an Proteine verschiebt sich dessen Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm, wobei die Zunahme der Absorption ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung darstellt (Bradford, 1976). Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte über das Pierce™ Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit nach den Angaben des Herstellers, wobei das MTP-Verfahren verwendet wurde. Dabei wurde ReoPro® als Standard und 1× PBS als Verdünnungspuffer verwendet. Die Messung der Absorption erfolgte bei 590 nm mithilfe des Versamax® ELISA Microplate Reader.

4.3.7 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Engvall & Perlmann, 1971)

4.3.7.1 Kompetitiver ELISA

Zur Identifizierung von D1.3 scFv-CaM-Fusionen, die eine Änderung der Affinität in Anwesenheit von M13-Peptid zeigen, wurde ein kompetitiver ELISA durchgeführt. Hierbei wurde das Bindungsverhalten der scFv-CaM-Varianten in zwei verschiedenen Puffern, ohne (Bedingung A) und mit M13-Peptid (Bedingung B), verglichen. Alle verwendeten Puffer wurden auf pH 8,0 eingestellt. Zur Immobilisierung des Antigens wurden Maxisorp® ELISA-Platten mit 100 ng Lysozym in 100 µL 1× TBS pro Kavität üN bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die

4 METHODEN

Platten mithilfe eines ELISA-Washers dreimal mit $1\times$ TBS-T gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch Zugabe von jeweils $350\ \mu\text{L}$ $1\times$ B-TBS für 1 h bei RT. In der Zwischenzeit wurden die zu vermessenden Proben verdünnt. Hierbei wurden crude Lysate aus einer Periplasmapräparation im MTP-Maßstab 1:10 in $1\times$ B-TBS/5 mM CaCl_2 (Bedingung A) oder $1\times$ B-TBS/5 mM CaCl_2 /1 μM M13-Peptid (Bedingung B) verdünnt. Gereinigte D1.3 scFv-CaM-Varianten wurden in den genannten Puffern auf 0,1 μM eingestellt. Nach einstündiger Vorinkubation der scFv-CaM-Fusionen bei RT wurden $100\ \mu\text{L}$ der verdünnten Proben in die geblockten und gewaschenen (dreimal mit $1\times$ TBS-T) ELISA-Platten überführt. Die Bindung der Antikörperfragmente an Lysozym erfolgte für 1,5 h bei RT. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte zum Nachweis gebundener D1.3 scFv-Fusionen die Zugabe des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers (αHis -HRP, 1:10.000 in $1\times$ B-TBS), welcher für 1 h bei RT inkubiert wurde. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Zugabe von $100\ \mu\text{L}$ TMB-Substrat pro Kavität. Die Reaktion wurde nach 5–15 min mit $100\ \mu\text{L}$ 0,5 M H_2SO_4 gestoppt und die Absorption bei 450 nm mithilfe des VersaMax® ELISA-Readers bestimmt.

4.3.7.2 Release-ELISA

Der *Release*-ELISA unterscheidet sich nur im Vorverdunnungsschritt vom kompetitiven ELISA. Des Weiteren wurde ein *Release*-Schritt durchgeführt, um zu evaluieren, ob bereits gebundene D1.3 scFv-CaM-Fusionen unter Einfluss von M13-Peptid vom Antigen dissoziieren. Hierbei wurde zum einen die peptidunabhängige Dissoziation in peptidfreiem Puffer (Bedingung A) und zum anderen die Dissoziation unter Einfluss von M13-Peptid (Bedingung B) bestimmt. Gereinigte scFv-Varianten wurden für beide Bedingungen in $1\times$ B-TBS/5 mM CaCl_2 auf 0,1 μM eingestellt und direkt (d.h. ohne Vorinkubationsschritt) in die geblockten und gewaschenen ELISA-Platten überführt. Die Bindung der Antikörperfragmente erfolgte für 1,5 h bei RT. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Zugabe von $100\ \mu\text{L}$ der *Release*-Lösungen (Bedingung A: $1\times$ B-TBS/5 mM CaCl_2 ; Bedingung B: $1\times$ B-TBS/5 mM CaCl_2 /1 μM M13-Peptid) und eine weitere Inkubation der Proben für 1 h bei RT. Im Anschluss wurden die Platten analog zum kompetitiven ELISA behandelt und entwickelt.

4.3.7.3 Titrations-ELISA

Zur weiteren Charakterisierung der D1.3 scFv-CaM-Fusionen wurde ein Titrations-ELISA durchgeführt. Es sollte evaluiert werden, ob die Modulierung der Affinität durch M13-Peptid spezifisch (d.h. abhängig von einer bestimmten Peptidkonzentration) erfolgt. Der Titrations-ELISA unterscheidet sich nur in der Zusammensetzung der Vorverdunnungspuffer vom kompetitiven ELISA. Von Spalte 11 bis 2 wurde die M13-Peptidkonzentration sequenziell 1:2 in $1\times$ B-TBS/5 mM CaCl_2 verdünnt (Startkonzentration in Spalte 11: 3,2 μM ; Endkonzentration in Spalte 2: 6,25 nM; Kontrolle in Spalte 1: 0 nM). Zur Evaluierung der Calciumabhängigkeit der

4 METHODEN

Interaktion zwischen Calmodulin und M13-Peptid wurde als Kontrolle eine Peptidtitration in $1\times$ B-TBS/5 mM EDTA durchgeführt.

4.4 Zellbiologische Methoden

4.4.1 Durchflusszytometrische Analyse von scFv-Fragmenten

4.4.1.1 Färbung von PBMC mit kruden scFv-CaM-Fusionen

Die Identifizierung von CaM-Fusionen alternativer Spezifitäten, die eine Änderung der Affinität in Anwesenheit von M13-Peptid zeigen, erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analyse. Zur ersten Charakterisierung der scFv-CaM-Fusionen wurden Zellfärbungen mit kruden Lysaten im 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß durchgeführt. Zur Analyse von α Biotin- und α FITC scFv-Varianten wurden humane Blutzellen (PBMC) mit passenden IgG-Konjugaten vorgefärbt. Pro Ansatz wurden 1×10^6 Zellen für 10 min auf Eis in 110 μ L $1\times$ B-TBS/5 mM CaCl_2 (pH 7,4) mit α CD14-Biotin bzw. α CD14-FITC (Verdünnung: 1:11) inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch Zugabe von 1 mL Puffer und Zentrifugation bei 300 g für 5 min bei 4 °C entfernt. Die Lagerung der Pellets erfolgte bis zum weiteren Schritt auf Eis.

Danach wurde jeweils 20 μ L EDTA-haltiger Zelleextrakt mit 20 mM CaCl_2 versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 20 μ M M13-Peptid (Bedingung B) oder einer gleichen Menge $1\times$ B-TBS/5 mM CaCl_2 (pH 7,4 [α Biotin, α FITC, α CD20] bzw. pH 8,0 [α CD14, α CD4]) (Bedingung A). Nach Vorinkubation (45 min, RT) wurden die Zelleextrakte auf Eis gestellt (5 min) und 1×10^6 PBMC in 80 μ L $1\times$ B-TBS/5 mM CaCl_2 (pH 7,4/8,0) zugegeben. Nach Inkubation auf Eis (20 min) wurden die Zellen durch Zugabe von 1 mL Puffer gewaschen (300 g, 5 min, 4 °C) und im Anschluss in 110 μ L $1\times$ B-TBS/5 mM CaCl_2 (pH 7,4/8,0) mit α His-PE bzw. α His-APC (nur bei Analyse von α FITC scFvs) (Verdünnung: 1:11) resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut mit 1 mL Puffer gewaschen (300 g, 5 min, 4 °C). Das Pellet wurde auf Eis gelagert und unmittelbar vor der Analyse in 1 mL $1\times$ B-TBS/5 mM CaCl_2 (pH 7,4/8,0) mit Propidiumiodid (Endkonzentration: 1 μ g/mL) resuspendiert. Die Analyse erfolgte am MACSQuant® Analyzer 10 im Single Tube Modus, wobei 10.000 Zellen pro Probe vermessen wurden.

4.4.1.2 Färbung von PBMC mit gereinigten scFv-CaM-Fusionen

Die weitere Charakterisierung gereinigter scFv-CaM-Fusionen erfolgte im MTP-Maßstab. Des Weiteren wurden Varianten des M13-Peptids und alternative Calmodulin-Bindepeptide auf ihre affinitätsverändernde Wirkung hin getestet. Vorfärbungen von PBMC mit α CD14-Biotin wurden wie bereits beschrieben (vgl. 4.4.1.1) durchgeführt. Gereinigte scFvs wurden in 50 μ L $1\times$ B-TBS/5 mM CaCl_2 (pH 7,4 [α Biotin] bzw. pH 8,0 [α CD14, α CD4]) auf geeignete

4 METHODEN

Konzentrationen eingestellt. Für kompetitive Analysen und Charakterisierung von Peptidbibliotheken wurde Peptid (M13-Peptid, M13-Varianten [Bibliothek], CBP-Varianten [Bibliothek]) im molaren Überschuss in einem Volumen von 5 μL zugegeben (Bedingung B), wohingegen der Kontrollansatz (Bedingung A) mit 5 μL 1 \times B-TBS/5 mM CaCl_2 (pH 7,4/8,0) versetzt wurde. Nach Vorinkubation (45 min, RT) wurden die Ansätze auf Eis gestellt (5 min) und 2×10^5 PBMC in 45 μL 1 \times B-TBS/5 mM CaCl_2 (pH 7,4/8,0) zugegeben. Nach Inkubation auf Eis (20 min) wurden die Zellen durch Zugabe von 185 μL Puffer gewaschen (300 g, 10 min, 4 °C) und im Anschluss in 110 μL 1 \times B-TBS/5 mM CaCl_2 (pH 7,4/8,0) mit $\alpha\text{His-PE}$ (Verdünnung: 1:11) resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut mit 185 μL Puffer gewaschen (300 g, 10 min, 4 °C). Die Pellets wurden auf Eis gelagert und unmittelbar vor der Analyse in 200 μL 1 \times B-TBS/5 mM CaCl_2 (pH 7,4/8,0) mit Propidiumiodid (Endkonzentration: 1 $\mu\text{g/mL}$) resuspendiert. Die Analyse erfolgte am MACSQuant® Analyzer 10 im Chill 96 Rack Modus, wobei 10.000 Zellen pro Probe vermessen wurden.

4.4.1.3 Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) mittels Titration

Die Bestimmung von Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_D) erfolgte über Titration der scFvs und Färbung von PBMC. Die Protokolle von Chao *et al.* (2006) und VanAntwerp & Wittrup (2000) wurden zur Titration von gegen CD14 gerichteten scFvs auf humanen PBMC modifiziert. Es musste beachtet werden, dass in jedem Titrationsansatz scFv im Überschuss zum potentiellen Antigen vorlag. Ein PBMC eines gesunden Spenders besteht zu 10–30 % aus CD14-positiven Monozyten, die bis zu 130.000 CD14-Moleküle pro Zelle präsentieren (Antal-Szalmás *et al.*, 1997). Somit sind in 1×10^6 PBMC bis zu $3,9 \times 10^{10}$ potentielle αCD14 scFv-Bindestellen vorhanden. Inkubationsvolumen für die Titration wurden so gewählt, dass immer ein mindestens 7,5-facher Überschuss an scFv vorlag.

1×10^6 Zellen wurden mit verschiedenen Mengen an gereinigtem scFv (1 nM bis 20 μM bzw. 60 μM) in einem Gesamtvolumen von 100 μL 1 \times B-TBS/240 μM CaCl_2 (pH 8,0) bzw. 1 \times B-TBS/240 μM CaCl_2 /M13-Peptid im Überschuss (pH 8,0) (Ausnahme: 1 nM in einem Gesamtvolumen von 1 mL) vermischt und im Anschluss bei 24 °C für 45 min zur Erreichung des Bindungsgleichgewichts inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mL Puffer und Zentrifugation (300 g, 5 min, 4 °C) abgestoppt. Die Zellen wurden danach in 110 μL 1 \times B-TBS/240 μM CaCl_2 (pH 8,0) mit $\alpha\text{His-FITC}$ (Verdünnung: 1:11) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff (300 g, 5 min, 4 °C) wurden die Pellets auf Eis gelagert und unmittelbar vor der Analyse in 0,9 mL 1 \times B-TBS/240 μM CaCl_2 (pH 8,0) mit Propidiumiodid (Endkonzentration: 1 $\mu\text{g/mL}$) resuspendiert. Die Analyse erfolgte am MACSQuant® Analyzer 10 im Single Tube Modus, wobei 10.000 Zellen pro Probe vermessen wurden. Die ermittelten *Mean fluorescence units* wurden normalisiert und zur

4 METHODEN

Kalkulation der K_D -Werte mittels GraphPad Prism 7 mit einem nichtlinearen Regressionsmodell (*one-site specific binding*) verwendet.

4.5 Biophysikalische Methoden

4.5.1 Intaktmassebestimmung von scFv-Fragmenten mittels LC/MS

Im Anschluss an die Reinigung erfolgte die Bestimmung der Intaktmasse der scFv-Fragmente mittels Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC/MS). Die Proben wurden an einem *micrOTOF-Q* (Bruker Daltonics, Bremen) durch das Analytik-Team der Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach) analysiert und im Anschluss ausgewertet. Aufgrund dessen erfolgt in dieser Arbeit keine weitere Beschreibung der Vorgehensweise und experimenteller Bedingungen.

4.5.2 Präparative Größenausschlusschromatographie (präparative SEC)

Die Reinigung von monomeren scFvs erfolgte über Größenausschlusschromatographie an einem ÄKTA-Purifier System. Es wurde eine selbstgepackte Säule (Säulenmaterial: Superdex™ 200 Prep Grade) verwendet. Es wurde 1× PBS (pH 7,4) als Laufpuffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL min⁻¹ verwendet. Das maximal zu injizierende Probenvolumen betrug 0,9 mL, wobei eine Mindestproteinmenge von 200 µg nicht unterschritten wurde. Zur Auswertung der Reinigung wurde der Verlauf der Absorption bei 280 nm betrachtet. Die Reinigung wurde durch den SEC-Service der Chemiegruppe der Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach) durchgeführt.

4.5.3 Analytische Größenausschlusschromatographie (analytische SEC)

Zur Evaluierung des genauen Schaltmechanismus der scFvs erfolgte deren Analyse mittels SEC. Die scFvs wurden mit einem molaren Überschuss an M13-Peptid (1,5-facher Überschuss) und Calcium (8- bis 10-facher Überschuss) vermischt und im Anschluss für mindestens 45 min bei RT inkubiert, um eine eventuelle Dimer- oder Multimerisierung der scFvs zu ermöglichen. Als Kontrolle wurden die jeweiligen scFvs nur unter Einfluss von Calcium analysiert. Die Analyse erfolgte über Größenausschlusschromatographie an einem Agilent 1100 HPLC-System. Die Auftrennung erfolgte über eine Yarra SEC-3000 Säule bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,35 mL min⁻¹. Das maximal zu injizierende Probenvolumen betrug 20 µL, wobei eine Mindestproteinmenge von 20 µg nicht unterschritten wurde. Als Standard wurde ein Gelfiltrationsstandard verwendet, der einen Bereich von 1,35 kDa bis 670 kDa umfasste. Die Auswertung erfolgte durch Betrachtung des Verlaufs der Absorption bei 280 nm. Die analytische SEC wurde durch das Analytik-Team der Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach) durchgeführt.

4.6 Statistik

4.6.1 Statistische Analysen mittels GraphPad Prism 7

Die statistische Analyse peptidabhängiger Signaländerungen wurde mittels GraphPad Prism 7 durchgeführt. Es wurden die Ratios der gemessenen Absorptionen (A_{450}) oder der medianen Fluoreszenzintensitäten (MFI) der unterschiedlichen Pufferbedingungen gebildet. Hierbei wurden die jeweils hohen Werte stets durch die niedrigen Werte dividiert, um eine Ratio ≥ 1 zu erhalten. Die Ratios der verschiedenen scFv-CaM-Fusionen wurden mit der jeweiligen Wildtypkontrolle verglichen. Der Vergleich von ≥ 3 Gruppen erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test mit anschließendem *Dunn's multiple comparison post-hoc test*. Beim Vergleich von 2 Gruppen wurde der Mann-Whitney Test angewandt. Der Alpha-Wert wurde stets auf 0,05 festgesetzt.

5 Ergebnisse

5.1 Erzeugung einer permutierten Calmodulin-Linker-Bibliothek im α -Lysozym scFv D1.3

Zur Identifikation der optimalen Anordnung des Calmodulin, um bei Insertion als Linkerregion eines scFvs eine stimulusabhängige Änderung der Bindungsstärke bewirken zu können, erfolgte die Erzeugung einer permutierten Calmodulin-Linker-Bibliothek im Modellantikörper scFv D1.3. Die Permutation von Calmodulin erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mittels PCR. Eine Übersicht zum genauen Klonierungsablauf ist in Abb. 5.1 dargestellt. Vorerst wurden an das für humanes Calmodulin codierende Gen (Genbank ID: ADD45181.1) flankierende Sequenzen, die für *Bam*HI-Restriktionsschnittstellen und einen Gly₄Ser-Linker codieren, angefügt. Im Anschluss erfolgte die Optimierung der Gensequenz zur rekombinanten Expression in *E. coli* und die Synthese des Gens durch DNA2.0 (Menlo Park, USA; Nukleotid- und Aminosäuresequenz im Anhang). Das getragene Plasmid wurde in *E. coli* NEB® 5-alpha transformiert, amplifiziert und mittels Plasmid-Reinigungs-Kit präpariert. Nachfolgend wurde die Zielsequenz durch Restriktion mit *Bam*HI aus dem Plasmid isoliert und über Gelextraktion gereinigt. Danach erfolgte die Zirkularisierung des Gens durch Behandlung mit T4-DNA-Ligase. Die Auftrennung des Ansatzes erfolgte im Agarosegel. Es wurde ein 1,8 % Trennsystem gewählt, da aufgrund der geringen Fragmentgrößen eine gute Trennleistung im Bereich zwischen 300 und 500 bp benötigt wurde. Der Großteil der DNA lag in zirkulärer Form (Laufhöhe bei ca. 350 bp) vor (siehe Abb. 5.2a), allerdings konnte auch lineares Ausgangsmaterial (456 bp) identifiziert werden. Ein geringer Teil der DNA lag in multimerisierter Form vor. Erfolgreich zirkularisierte Moleküle wurden über Gelextraktion gereinigt und als Template in der Permutagenese-PCR eingesetzt. Insgesamt wurden 152 verschiedene Oligonukleotidpaare (synthetisiert durch Metabion, Planegg/Steinkirchen) zur Amplifikation der 152 möglichen CaM-Permutanten erzeugt. Die Oligonukleotide enthielten jeweils Überhänge mit Restriktionsschnittstellen (*fwd*-Oligonukleotid: *Nhe*I, *rev*-Oligonukleotid: *Eco*RV), um die anschließende Klonierung der verdauten PCR-Produkte in den Expressionsvektor pOPE313 D1.3 scFv HH zu erleichtern. Nach Abschluss der PCR wurde jeweils ein Teil der Ansätze (4 μ L) zur Verifizierung der Produktgröße (480 bp) gelelektrophoretisch analysiert. In Abb. 5.2b ist exemplarisch ein analytisches Agarosegel aufgeführt. Der restliche PCR-Ansatz wurde mittels NucleoSpin® Gel and PCR clean-up Kit entsalzt und im Anschluss mit *Nhe*I und *Eco*RV verdaut. Nach Hitzeinaktivierung der Enzyme erfolgte die Ligation mit dem analog restringierten und über Gelextraktion gereinigten Vektor. Die Ligationsansätze wurden im Anschluss in den Expressionsstamm *E. coli* W3110 transformiert. Pro Konstrukt wurden 3 Klone im MTP-Maßstab kultiviert und als Glycerinkulturen gesichert.

5 ERGEBNISSE

Positive Klone mit permutiertem Calmodulin-Insert wurden über Kolonie-PCR mit den Primern D1.3 scFv VH_fwd und pOPE_rev2 identifiziert. In Abb. 5.2c ist exemplarisch ein analytisches Agarosegel einer Kolonie-PCR dargestellt. Insgesamt konnten 145 der 152 möglichen permutierten CaM-Varianten als Linkerregion in scFv D1.3 eingebracht werden. Bei den 7 verbliebenen Konstrukten konnte entweder kein PCR-Produkt generiert werden oder die Transformation von *E. coli* W3110 mit den Ligationsansätzen resultierte ausschließlich in Klonen ohne passendes Insert.

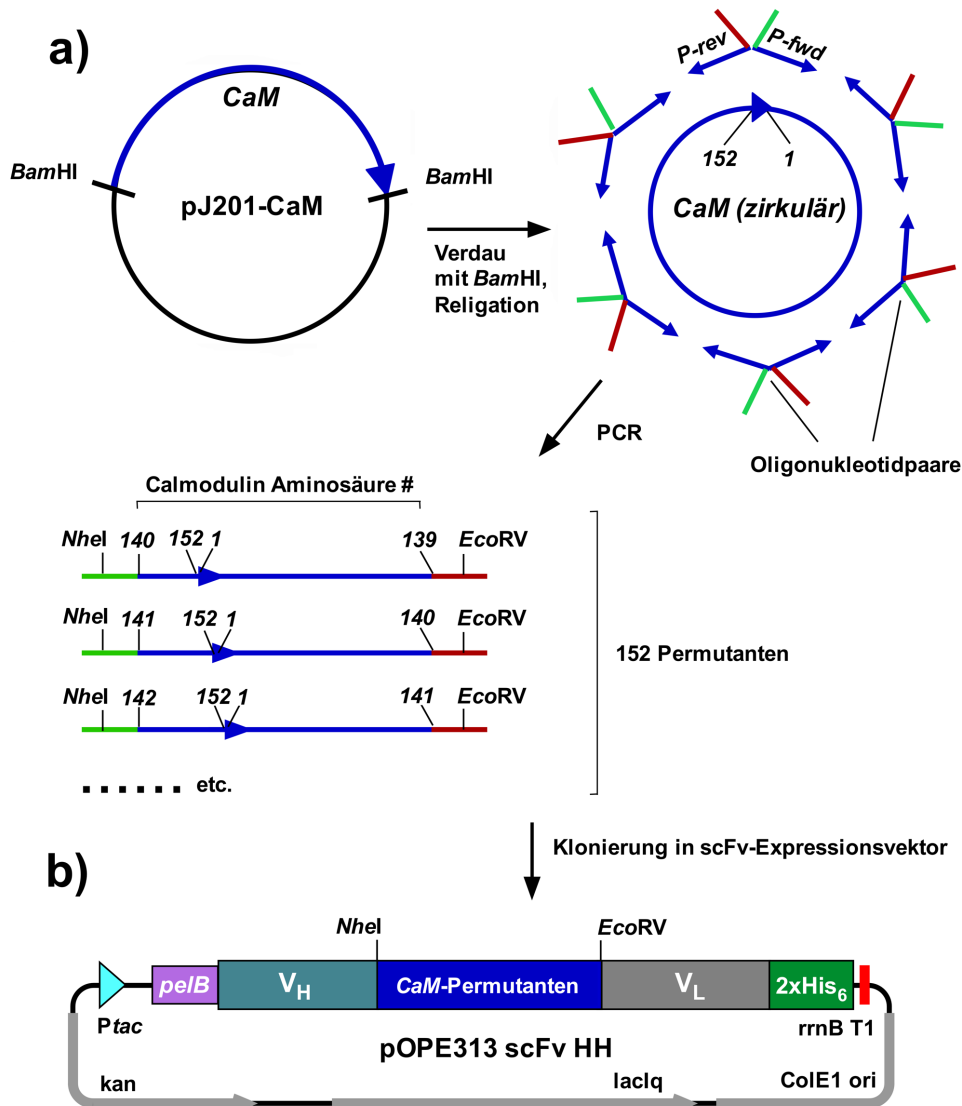


Abb. 5.1: Erzeugung permutierter Calmodulin-Varianten mittels PCR – Strategieüberblick

a) Nach Isolierung des für Calmodulin (CaM)-codierenden Gens erfolgte die Zirkularisierung des Moleküls, welches im Anschluss als Template für die Permutagenese-PCR verwendet wurde. Nach erfolgreicher Erzeugung der PCR-Produkte erfolgte die Klonierung der verdauten Nukleotidsequenzen in den Expressionsvektor pOPE313 D1.3 scFv HH. Abkürzungen, P-rev: reverse-Oligonukleotid mit EcoRV-Erkennungssequenz-Überhang; P-fwd: forward-Oligonukleotid mit NheI-Erkennungssequenz-Überhang.

b) Dargestellt ist eine Übersicht des verwendeten Expressionsvektors. Abkürzungen, Ptac: tac-Promotor; pelB: Signalpeptid; V_H/V_L: variable Region der schweren/leichten Kette; NheI/EcoRV: Restriktionsschnittstellen; 2xHis₆: Doppel-Histidin-Tag; rrnB T1: Transkriptionsterminator; ColE1 ori: Replikationsursprung; laclq: laclq-Promotor; kan: Kanamycin-Resistenz.

5 ERGEBNISSE

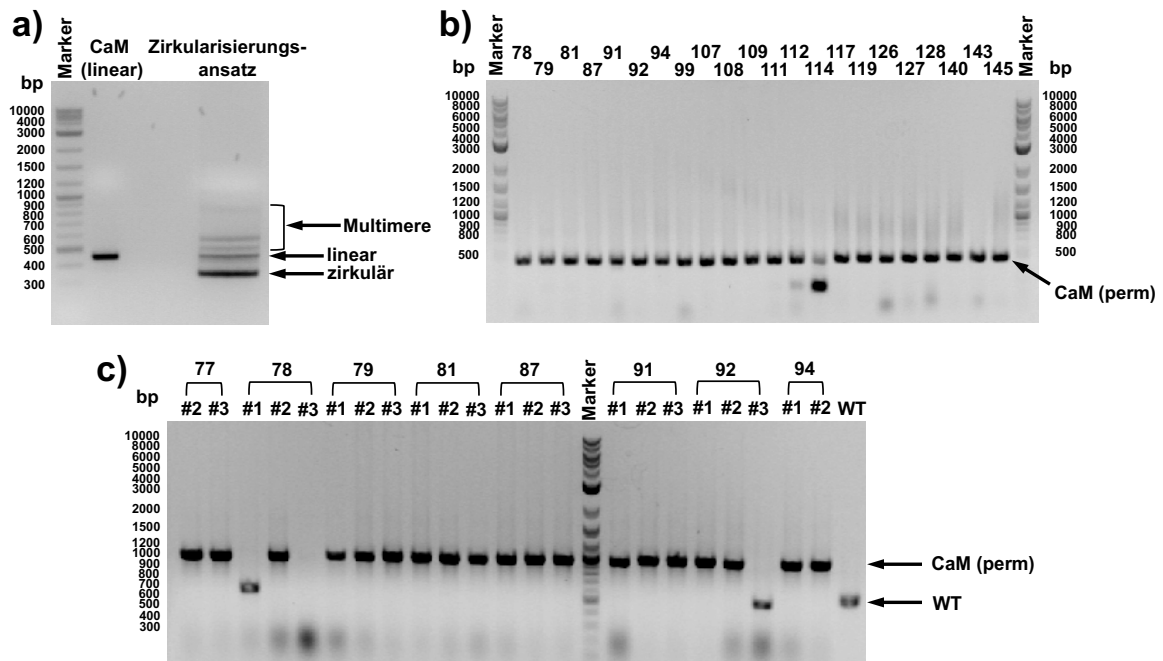


Abb. 5.2: Erzeugung permutierter Calmodulin-Varianten mittels PCR – Zirkularisierung, Permutagenese-PCR und Kolonie-PCR

a) Zirkularisierung: Der komplette Zirkularisierungsansatz (ca. 11 µg DNA) wurde im 1,8 % Agarosegel aufgetrennt. Lineares CaM (456 bp) wurde als Kontrolle verwendet. Zirkuläres CaM lag aufgrund der höheren Wanderungsgeschwindigkeit im Gel bei ca. 350 bp vor.

b) Permutagenese-PCR: ein Teil der PCR-Produkte (4 µL) wurde gelelektrophoretisch (1 % Agarosegel) analysiert. Erfolgreich amplifizierte permutierte CaM-Varianten konnten durch eine Bande bei 480 bp identifiziert werden.

c) Kolonie-PCR: Die kompletten Kolonie-PCR-Ansätze wurden im Agarosegel (1 %) aufgetrennt. Positive Klone mit permutiertem Calmodulin als scFv-Linker wurden durch eine Bande bei 932 bp identifiziert, wohingegen Klone ohne Insert oder WT-Linker eine Bande bei ca. 533 bp aufwiesen.

5.2 Identifizierung schaltbarer scFv D1.3-Calmodulin-Varianten mittels kompetitivem ELISA

Wie bereits erwähnt (vgl. 2.4) kommt es bei Bindung des M13-Peptids durch $(\text{Ca}^{2+})_4$ -Calmodulin zu einer Konformationsänderung des Calmodulin (Ikura *et al.*, 1992). Zur Evaluierung des Einflusses des M13-Peptids auf verschiedene scFv D1.3-Calmodulin-Varianten wurden alle erzeugten permutierten Konstrukte im MTP-Maßstab produziert. ScFv-haltige Periplasmaüberstände wurden mittels kompetitivem ELISA (vgl. 4.3.7.1) im Hinblick auf das Ausmaß ihrer Bindung an auf der ELISA-Platte immobilisiertes Lysozym analysiert. Die Stärke des Bindungssignals ohne Peptid wurde dabei mit der gewonnenen Signalintensität des scFvs unter Einfluss von M13-Peptid verglichen und stellte somit ein Maß für die Schaltbarkeit der einzelnen Varianten dar. Die Antigenbindung erfolgte in beiden Ansätzen in calciumhaltigem Puffer, da Calmodulin nur in calciumgebundener Form eine Bindung mit dem M13-Peptid eingehen kann.

Der Großteil (128 von 145 Varianten, somit 88,27 %) der analysierten scFv-CaM-Varianten zeigte unter Einfluss von M13-Peptid eine geringere Bindung an das gebundene Lysozym als im peptidfreien Ansatz (siehe Abb. 5.3). Bei einigen Konstrukten (11 von 145, somit 7,59 %) konnte hingegen eine leichte Signalzunahme unter Peptideinfluss beobachtet werden. Die restlichen Varianten (6 von 145, somit 4,14 %) als auch die Wildtyp-Kontrolle (D1.3 scFv mit $[\text{G}_4\text{S}]_3$ -Linker) (siehe Abb. 5.3, rechts) wurden durch das Calmodulin-Bindepeptid in ihrer Antigenbindung nicht beeinflusst. Die größten Differenzen konnten für Permutationsvarianten beobachtet werden, bei denen die Lokalisation der neuen Termini in drei bestimmten Regionen des Calmodulins lag: nahe des N-Terminus, nahe des C-Terminus, sowie in der Mitte der Wildtyp-Sequenz (siehe Abb. 5.4). Pro Region wurden jeweils zwei Varianten ausgewählt, die eine besonders hohe peptidabhängige Signalabnahme aufzeigten. Sie wurden entsprechend ihrer Permutationsstelle benannt (siehe Abb. 5.3, N-perm-1+2, M-perm-1+2, C-perm-1+2) und in den folgenden Versuchen weiter charakterisiert.

Zusammenfassend wurde beobachtet, dass die Insertion verschiedener permutierter Calmodulinmoleküle als Linkerregion des α -Lysozym scFv D1.3 zu einer M13-Peptid-abhängigen Änderung der Bindungsstärke des Antikörperfragments führte. Die Permutation an 139 von 145 getesteten Aminosäurepositionen (95,86 %) führte zur Generierung eines schaltbaren scFv, wobei die stärkste Änderung des Bindungssignals bei C-terminal, N-terminal oder mittig permutierten Varianten beobachtet werden konnte.

5 ERGEBNISSE

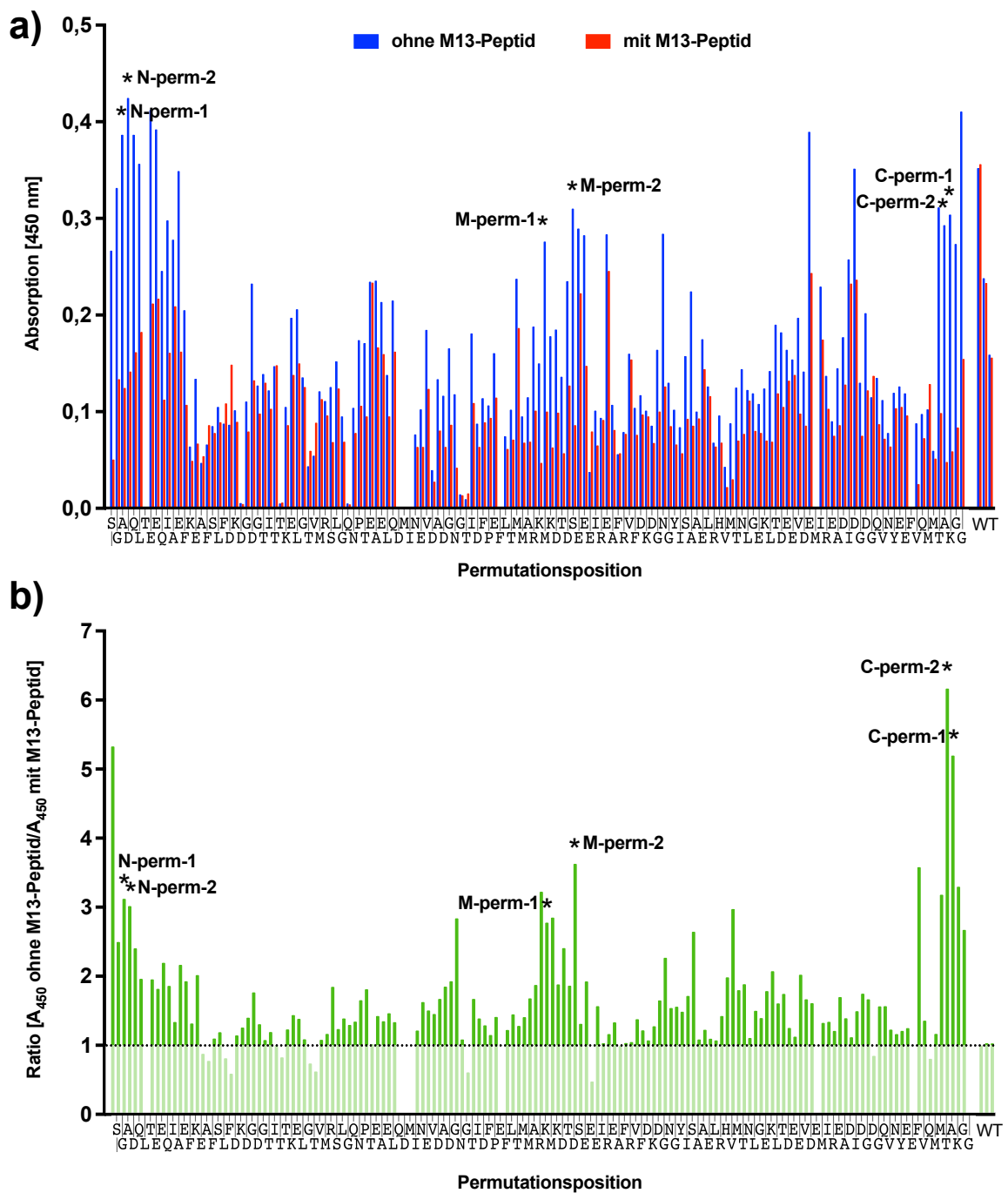


Abb. 5.3: Kompetitiver ELISA zur Identifizierung schaltbarer scFv D1.3-Calmodulin-Varianten

Jede Kavität wurde mit 100 ng Lysozym beschichtet. Die Menge gebundener scFv D1.3-CaM-Varianten unter zwei verschiedenen Bedingungen wurde verglichen. scFv D1.3 mit (G₄S)₃-Linker wurde als Kontrolle verwendet (WT). In Abbildung **a**) sind die erzielten Absorptionen im direkten Vergleich aufgeführt (blaue Säule: Bindung unter Einfluss von Calcium; rote Säule: Bindung unter Einfluss von Calcium und M13-Peptid), wohingegen in **b**) das Verhältnis der Signale zueinander dargestellt ist. Ein Faktor (Ratio) größer als 1 entspricht einer peptidabhängigen Abnahme des Bindungssignals, ein Faktor unter 1 dementsprechend einer Zunahme. Der Nachweis gebundener Antikörperfragmente erfolgte mit α His-HRP (1:10.000) und TMB-Substrat. Die vielversprechendsten Varianten wurden durch Sternchen gekennzeichnet und entsprechend ihrer Permutationsstelle benannt (N-perm-1/2: N-terminal permutiert; M-perm-1/2: in der Mitte des ursprünglich für Calmodulin codierenden Gens permutiert; C-perm-1/2: C-terminal permutiert). Die Aminosäuren der genauen Permutationsstellen sind unter den korrespondierenden Säulen angegeben, wobei die Permutationsstellen der ersten Aminosäure der permutierten Variante entsprechen.

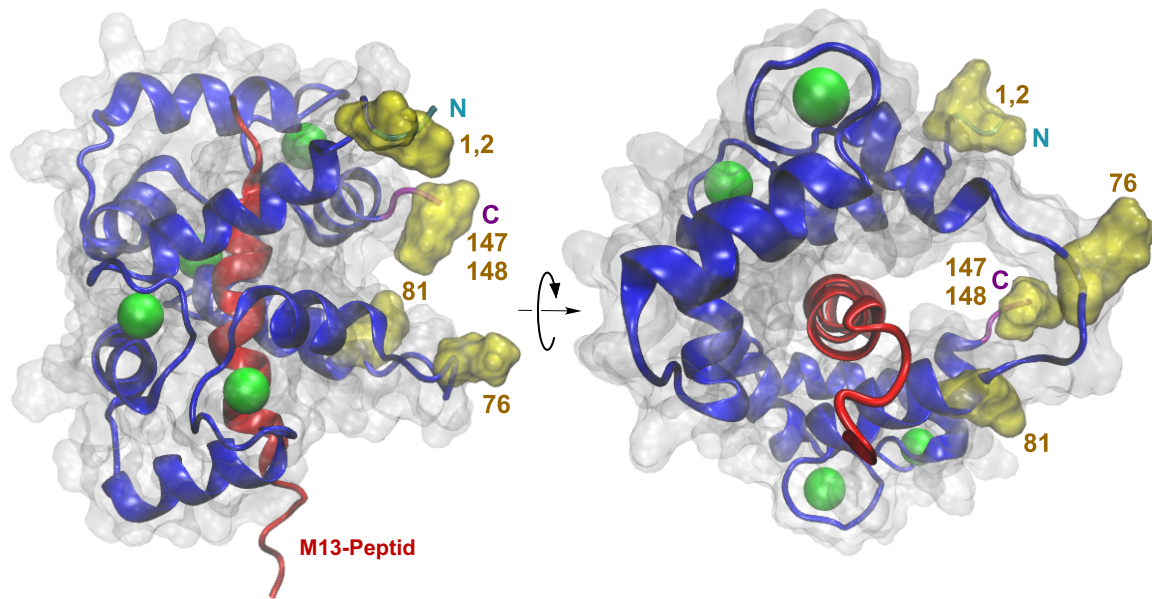


Abb. 5.4: Ligationsstellen permutierter CaM-Varianten mit starkem bindungsmodulierendem Effekt in scFv D1.3

Das Modell wurde basierend auf PDB ID 2BBM (Calmodulin in Komplex mit M13-Peptid) (Ikura *et al.*, 1992) erzeugt. Die Permutationsstellen, welche die stärksten Bindungsänderungen bewirkten, sind durch gelbe Färbung der zugehörigen Aminosäureseitenketten hervorgehoben. Die Zahlen geben die zugehörigen Aminosäurepositionen basierend auf der WT-CaM-Variante ohne GGSG-Linker an. Abkürzungen, N/C: N/C-Terminus; 1,2: N-perm-Varianten; 76/81: M-perm-Varianten; 147/148: C-perm-Varianten.

5.3 Evaluierung der M13-Peptid-abhängigen Affinitätsänderung verschiedener scFv D1.3-Calmodulin-Fusionen

5.3.1 Sequenzverifizierung, Reinigung und Intaktmassebestimmung ausgewählter scFv D1.3-Calmodulin-Varianten

Die Inserts der Vektoren derjenigen ausgewählten scFv D1.3-CaM-Fusionen (siehe Tab. 5.1), die im ersten ELISA-Screening eine besonders hohe peptidabhängige Signalabnahme gezeigt hatten, wurden sequenziert, da bis zu diesem Zeitpunkt lediglich die Insertgröße mittels Kolonie-PCR bestätigt worden war (vgl. 5.1). Hierfür erfolgte die Präparation der Plasmide und anschließende Sequenzierung der Konstrukte mit den Oligonukleotiden D1.3 scFv VH_fwd und D1.3 scFv VL_rev. Die Nukleotidsequenz der Linkerregion konnte in allen Fällen als korrekt bestätigt werden. Ferner wurde eine scFv D1.3-Calmodulin-Variante erzeugt, die natives (d.h. nicht permutiertes) Calmodulin als Linkerregion besaß. Auch hier wurde die Linkersequenz mittels Sequenzierung verifiziert.

Tab. 5.1: Vielversprechende scFv D1.3-Calmodulin-Fusionen

<i>Variante</i>	<i>Permutationsstelle</i> <i>(entspricht erster AS der permutierten Variante)</i>
scFv D1.3 – CaM linear	–
scFv D1.3 – CaM N-perm-1	3/A (Position in WT-CaM: 1)
scFv D1.3 – CaM N-perm-2	4/D (Position in WT-CaM: 2)
scFv D1.3 – CaM M-perm-1	78/M (Position in WT-CaM: 76)
scFv D1.3 – CaM M-perm-2	83/S (Position in WT-CaM: 81)
scFv D1.3 – CaM C-perm-1	150/K (Position in WT-CaM: 148)
scFv D1.3 – CaM C-perm-2	149/A (Position in WT-CaM: 147)

Im Anschluss erfolgte die Produktion der verschiedenen scFv-Fusionen im 500 mL-Maßstab. Daraufhin wurden die Proteine über His-Tag mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie aus den Periplasmaüberständen der Kulturpellets gereinigt. Nachfolgend wurden die zielproteinhaltigen Eluatfraktionen gegen 1× TBS dialysiert, um vorhandenes Phosphat im Elutionspuffer, welches mit Calcium interferieren könnte, zu eliminieren. Die Reinheit der dialysierten Eluate wurde mittels SDS-PAGE bestimmt (siehe Abb. 5.5). In der SDS-PAGE konnten nur sehr geringe Proteinverunreinigungen (Laufhöhe zwischen 25 und 35 kDa) festgestellt werden, die für den weiteren Verlauf der Experimente als unkritisch eingestuft wurden. Des Weiteren wiesen die verschiedenen scFv-Varianten ein unterschiedliches Laufverhalten auf. Untereinander zeigten Varianten mit ähnlichen Permutationsstellen des Calmodulin ein nahezu identisches Migrationsverhalten. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass dies durch die jeweiligen Linkervarianten verursacht wurde.

5 ERGEBNISSE

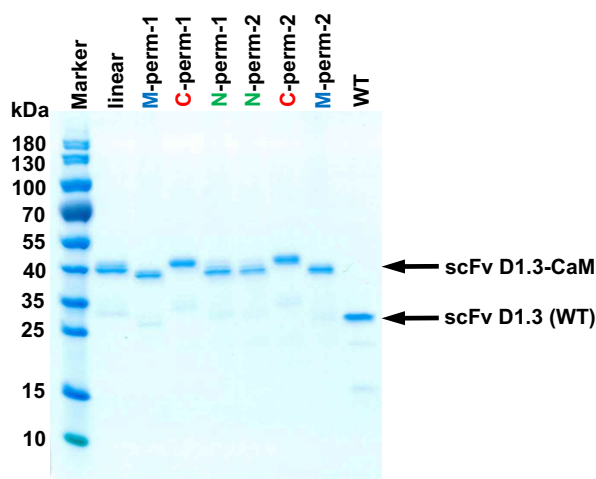


Abb. 5.5: Qualitätskontrolle gereinigter scFv D1.3-Varianten mittels SDS-PAGE

Es wurde jeweils 1 µg der gereinigten scFv D1.3-Varianten auf ein Tris-Glycin-Gradientengel (4–20 %) aufgetragen. Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blau G250 angefärbt.

Zur Überprüfung des Molekulargewichts der gereinigten scFv D1.3-Varianten wurden die Proben mittels Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC/MS) analysiert, wodurch die Intaktmasse bestimmt werden konnte. Dies wurde durch das Analytik-Team der Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach) durchgeführt. Die mittels Massenspektrometrie ermittelten Molekulargewichte stimmten nahezu mit den mittels *ExPASy Bioinformatics Online Tool* errechneten Werten überein (siehe Tab. 5.2), sodass das unterschiedliche Laufverhalten in der SDS-PAGE unabhängig vom Molekulargewicht der scFv-Fusionen verursacht worden sein musste.

Tab. 5.2: Intaktmassebestimmung gereinigter scFv D1.3-Varianten

Variante	Masse laut LC/MS [Da]	Masse laut ExPASy [Da]
scFv D1.3 – WT	28.123,0	28.127,9
scFv D1.3 – CaM linear	43.882,1	43.886,4
scFv D1.3 – CaM N-perm-1	44.139,5	44.144,6
scFv D1.3 – CaM N-perm-2	44.139,3	44.144,6
scFv D1.3 – CaM M-perm-1	44.140,3	44.144,6
scFv D1.3 – CaM M-perm-2	44.140,0	44.144,6
scFv D1.3 – CaM C-perm-1	44.139,9	44.144,6
scFv D1.3 – CaM C-perm-2	44.139,8	44.144,6

5.3.2 Evaluierung der peptidabhängigen Änderung der Bindung gebundener scFv D1.3-Calmodulin-Varianten mittels Release-ELISA

Im ersten ELISA-Screening konnte gezeigt werden, dass eine Vorinkubation der scFv D1.3-CaM-Varianten mit dem M13-Peptid eine Änderung der Bindung des scFvs zum Antigen bewirkte. Daraufhin stellte sich die Frage, ob auch eine Dissoziation des bereits etablierten Antigen-Antikörper-Komplexes durch Zugabe von Peptid ebenfalls möglich sei. Zur Evaluierung dieser

5 ERGEBNISSE

Fragestellung wurde ein *Release*-ELISA (vgl. 4.3.7.2) durchgeführt. Nach einer initialen Assoziationsphase der scFv-Varianten an das Antigen Lysozym in calciumhaltigem Puffer erfolgte die Zugabe von M13-Peptid. Als Kontrolle wurde peptidfreier Puffer als *Release*-Reagenz verwendet, um die peptidunabhängige Dissoziation des scFvs vom Antigen bestimmen zu können. Zum Vergleich wurden die scFv-Varianten nach dem kompetitiven Protokoll (vgl. 4.3.7.1) behandelt.

Die Abnahme der Bindungssignale, die jeweils im *Release*-Protokoll erzielt wurden (siehe Abb. 5.6, rechts), war mit der Abnahme der Absorption unter Peptideinfluss im kompetitiven Protokoll (siehe Abb. 5.6, links) vergleichbar, wobei die Unterschiede zum Wildtyp im *Release*-Protokoll noch etwas ausgeprägter waren. Die höchste peptidabhängige Änderung des Signals zeigten die scFv-Varianten mit C-terminal permutiertem (C-perm-1, C-perm-2) Calmodulin als Linker und die M-perm-1-Variante. Die WT-Kontrolle zeigte in beiden Protokollen keine peptidabhängige Abnahme der Absorption, wodurch bestätigt wurde, dass die Interaktion zwischen Calmodulin und M13-Peptid für die Änderung der Bindungsstärke essentiell ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine spezifische Dissoziation des Antigen-Antikörper-Komplexes durch Zugabe von M13-Peptid möglich ist, was auf eine peptidabhängige Verringerung der Bindeaffinität hinweist und einen allosterischen Mechanismus dafür nahelegt.

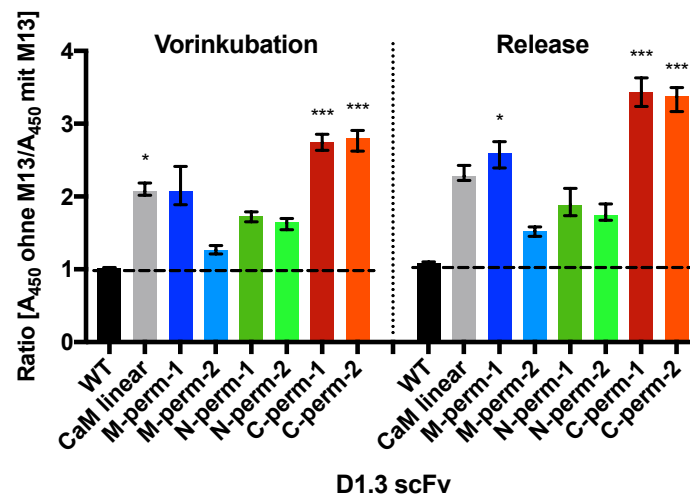


Abb. 5.6: *Release*-ELISA – Evaluierung peptidabhängiger Affinitätsänderung gebundener scFv D1.3-Calmodulin-Varianten

Jede Kavität wurde mit 100 ng Lysozym beschichtet und das Dissoziations- und Bindungsverhalten von 0,1 µM scFv D1.3 bestimmt. Die Menge gebundener scFv D1.3-CaM-Varianten unter zwei verschiedenen Pufferbedingungen und zwei verschiedenen ELISA-Protokollen wurde verglichen. scFv D1.3 mit (G₄S)₃-Linker wurde als Kontrolle verwendet (WT). Ein Faktor (Ratio) größer als 1 entspricht einer peptidabhängigen Abnahme des Bindungssignals. **Links:** Kompetitiver ELISA (A₄₅₀ ohne M13: gebundener scFv nach Vorinkubation in calciumhaltigem Puffer; A₄₅₀ mit M13: gebundener scFv nach Vorinkubation in calcium- und peptidhaltigem Puffer). **Rechts:** *Release*-ELISA (A₄₅₀ ohne M13: gebundener scFv nach *Release* in calciumhaltigem Puffer; A₄₅₀ mit M13: gebundener scFv nach *Release* in calcium- und peptidhaltigem Puffer). Der Nachweis gebundener Antikörperfragmente erfolgte mit αHis-HRP (1:10.000) und TMB-Substrat. Die gemessene Absorption wurde normalisiert, wobei das Signal der WT-Kontrolle in calciumhaltigem Puffer auf 100 % gesetzt wurde. Es wurde jeweils der Mittelwert aus 4 Experimenten (n=4) bestimmt, wobei die Fehlerbalken die Spannweite darstellen. Die statistische Analyse erfolgte mittels GraphPad Prism 7, wobei der jeweilige WT als Vergleichswert verwendet wurde (Kruskal-Wallis Test mit Dunn's multiple comparison post-hoc test; *p < 0,05; ***p < 0,001).

5.3.3 Verifizierung der spezifischen Interaktion zwischen Calmodulin-Linker und M13-Peptid mittels Titrations-ELISA

Im Anschluss erfolgte die weitere Verifizierung der spezifischen Interaktion zwischen Calmodulin-Linker und M13-Peptid. Ein Molekül Calmodulin benötigt im Normalfall 4 Calciumionen, um ein Molekül M13-Peptid binden zu können (Ikura *et al.*, 1992). Somit sollte bei einem equimolaren Verhältnis von scFv-CaM-Fusion zu M13-Peptid ein Maximum an peptidabhängiger Bindungsänderung erreicht worden sein. Zur Evaluierung der Fragestellung wurde ein Titrations-ELISA (vgl. 4.3.7.3) durchgeführt, bei dem das Bindungsverhalten von 0,1 μM scFv in Abhängigkeit von steigender Peptidkonzentration bestimmt wurde. Die Bestimmung erfolgte in calciumhaltigem Puffer. Eine Kontrolltitration wurde in EDTA-haltigem Puffer durchgeführt, um eventuelle calciumunabhängige Effekte des M13-Peptids auf die scFv-CaM-Varianten abschätzen zu können.

Nahezu alle analysierten scFv-CaM-Varianten zeigten eine calciumabhängige Verringerung der Bindung mit steigender Peptidkonzentration. Bei Überschreitung einer Konzentration von 0,1 μM Peptid, einem equimolaren Verhältnis von scFv-CaM-Fusion zu Peptid, konnte keine weitere signifikante Abnahme der Absorption beobachtet werden (vgl. Abb. 5.7, rote Rhomben). Nur die M-perm-2-Variante (Abb. 5.7d) zeigte diese Tendenz nicht und verhielt sich ähnlich der Wildtypkontrolle (Abb. 5.7a). Die größte peptidabhängige Bindungsänderung konnte bei den C-terminal permutierten (Abb. 5.7g,h) und der M-perm-1-Variante (Abb. 5.7c) beobachtet werden, was die Ergebnisse des vorangehenden *Release*-ELISA (vgl. 5.3.2, Abb. 5.6) bestätigte. Ferner zeigte die Kontrolltitration in EDTA-haltigem Puffer, dass steigende Konzentrationen von M13-Peptid bei Abwesenheit von Calcium keinen signifikanten Einfluss auf das Bindungsverhalten der scFv-Fusionen hatten (vgl. Abb. 5.7, blaue Quadrate). Allerdings wurde die allgemeine Bindungsstärke der scFv-Fusionen durch EDTA beeinflusst, da die gemessenen Absorptionen deutlich geringer waren als in der Titration unter Einfluss von Calcium. Dies könnte auf die Chelatierung von benötigten Kofaktoren zurückzuführen sein, die möglicherweise die Ausbildung der Antigen-Antikörper-Bindung unterstützen (Zhou *et al.*, 2005).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass 6 von 7 getesteten scFv-CaM-Varianten eine spezifische peptidabhängige Änderung der Bindungsstärke zeigten, wobei die maximale Änderung bei einem equimolaren Verhältnis von scFv-CaM-Fusion zu M13-Peptid erreicht wurde.

5 ERGEBNISSE

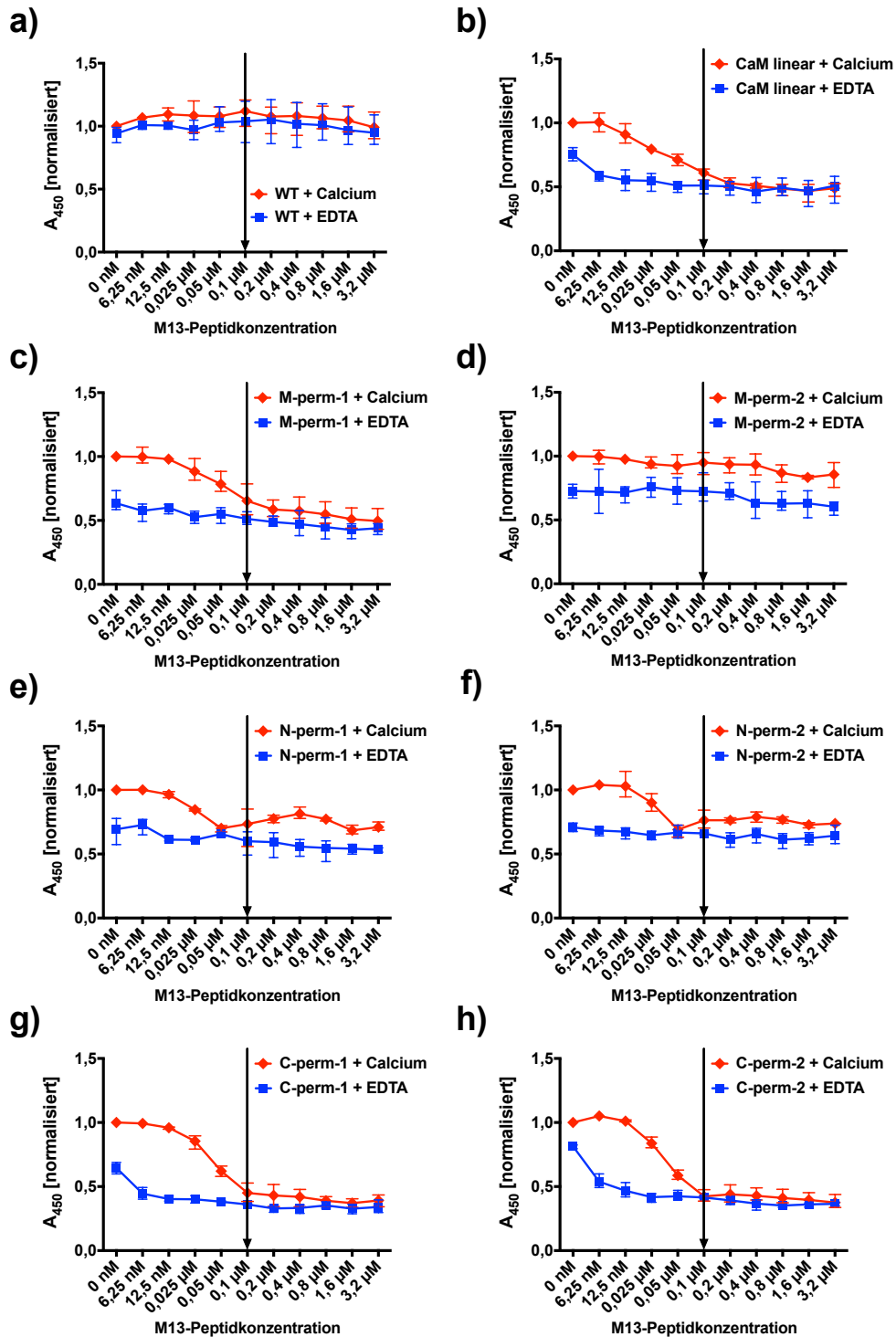


Abb. 5.7: Titrations-ELISA – Verifizierung spezifischer Interaktion zwischen Calmodulin-Linker und M13-Peptid

Jede Kavität wurde mit 100 ng Lysozym beschichtet. Das Bindungsverhalten von 0,1 µM scFv D1.3-CaM-Varianten in Abhängigkeit steigender M13-Peptidkonzentration wurde in calciumhaltigem (rote Rhomben) und EDTA-haltigem Puffer (blaue Quadrate) bestimmt. scFv D1.3 mit (G₄S)₃-Linker wurde als Kontrolle verwendet (WT). Der Sättigungspunkt (molares Verhältnis von M13-Peptid:scFv entspricht 1:1) ist durch Pfeile markiert. Der Nachweis gebundener Antikörperfragmente erfolgte mit αHis-HRP (1:10.000) und TMB-Substrat. Die gemessene Absorption wurde normalisiert, wobei das Signal der jeweiligen scFv-Variante in calciumhaltigem Puffer bei 0 nM M13-Peptid auf 100 % gesetzt wurde. Es wurde jeweils der Mittelwert aus 3 Experimenten (n=3) bestimmt, wobei die Fehlerbalken die Spannweite darstellen.

5.4 Übertragung des Calmodulin-Linker basierten Systems auf weitere scFv-Spezifitäten

5.4.1 Klonierung ausgewählter Calmodulin-Linker in diverse scFv-Spezifitäten

Anhand des α -Lysozym scFv D1.3 konnte gezeigt werden, dass durch Insertion diverser Calmodulinmoleküle als Linkerregion des scFvs eine Generierung schaltbarer scFv-Varianten möglich ist. Im Folgenden wurde evaluiert, ob eine Übertragung dieser Linkermodule auf andere scFv-Spezifitäten ebenfalls in schaltbaren Antikörperfragmenten resultiert. Hierfür erfolgte die Klonierung der zuvor charakterisierten vielversprechendsten Linkervarianten in 5 weitere scFv-Spezifitäten. Die Spezifitäten wurden bezüglich ihrer potentiell möglichen Anwendung für die Zellseparation und Zellfärbung ausgesucht. Zum einen wurden drei gegen humane Zelloberflächenmarker gerichtete scFvs (CD14, CD20 und CD4) ausgewählt. Zum anderen erfolgte die Klonierung der Linkervarianten in zwei gegen Haptene gerichtete Antikörperfragmente (Biotin und der Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat). Der Aufbau der Konstrukte (vgl. Abb. 5.8) unterschied sich teilweise bezüglich der verwendeten Signalpeptide und der Orientierung der leichten und schweren Kette des scFv. Die Integration der Calmodulin-Linker erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *NheI* und *EcoRV*. Positive Klone mit korrekt integriertem Linker wurden durch Testrestriktionen und Sequenzierung mit den Oligonukleotiden pOPE201_f3 und pOPE_rev3 identifiziert.

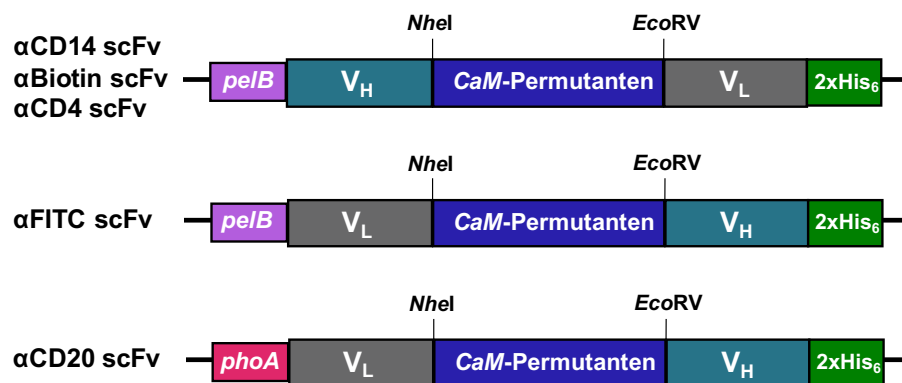


Abb. 5.8: Konstruktüberblick der einzelnen scFv-Spezifitäten

Dargestellt ist ein Konstruktüberblick der verschiedenen verwendeten Spezifitäten. Abkürzungen, pelB/phoA: Signalpeptid; V_H/V_L: variable Region der schweren/leichten Kette; *NheI*/*EcoRV*: Restriktionsschnittstellen; 2xHis₆: Doppel-Histidin-Tag.

5.4.2 Identifizierung schaltbarer scFv-Calmodulin-Varianten mittels kompetitiver PBMC-Färbung

Nach erfolgreicher Klonierung der verschiedenen scFv-Calmodulin-Varianten erfolgte die Identifizierung schaltbarer Fusionsproteine mittels PBMC-Färbung (vgl. 4.4.1.1). Wie bereits für den ersten ELISA (vgl. 5.2) wurden alle erzeugten permutierten Konstrukte im MTP-Maßstab

produziert. Die scFv-haltigen Periplasmaüberstände wurden im Anschluss in einem kompetitiven Ansatz zur Färbung von PBMC verwendet. Wie zuvor im kompetitiven ELISA wurde das Ausmaß der Antigenbindung unter zwei verschiedenen Bedingungen (mit und ohne M13-Peptid) analysiert und miteinander verglichen. Gebundene scFvs wurden mit fluoreszenzmarkierten α His-Antikörpern detektiert, wodurch eine durchflusszytometrische Analyse ermöglicht wurde. Die *Gating*-Strategie ist in Abb. 5.9 dargestellt. Zelldebris und tote Zellen wurden mithilfe von Propidiumiodid ausgeschlossen und im Anschluss wurde die Fluoreszenzfärbung der verbliebenen Population analysiert. Zum direkten Vergleich der Fluoreszenzintensität der verschiedenen Ansätze erfolgte die Darstellung als *Histoplot*.



Dargestellt ist die verwendete *Gating*-Strategie am Beispiel der α CD14 scFv-CaM M-perm-2-Variante. 1) Im ersten Schritt erfolgte der Ausschluss von Zelldebris durch Betrachtung der Größe (FSC-A) gegen die Granularität (SSC-A) der Events. 2) Im Anschluss wurden tote Zellen innerhalb des im ersten Schritt festgelegten Bereiches durch Färbung mit Propidiumiodid (PI-A) ausgeschlossen. 3) Die Betrachtung lebender α His-PE-positiver Zellen gegen deren Größe erfolgte im letzten Schritt der Analyse. 4) Zum Schluss erfolgte die vergleichende Analyse α His-PE-positiver Zellen der verschiedenen Bedingungen durch Darstellung als *Histoplot*.

In Abb. 5.10 sind die Ergebnisse der ersten Analyse mit kruden Periplasmaüberständen zusammengefasst. Die größte peptidabhängige Signalabnahme konnte bei den α CD14 scFv-Varianten beobachtet werden (Abb. 5.10, erste Reihe). Die gleiche Tendenz zeigte sich im Fall der α CD20 scFv-CaM-Fusionen (Abb. 5.10, zweite Reihe), wobei der gemessene Unterschied jedoch nur sehr gering war. Im Fall der α Biotin scFv-Varianten (Abb. 5.10, dritte Reihe) resultierten nur zwei Linker (M-perm-1, M-perm-2) in einer sichtbaren peptidabhängigen Signalabnahme, obwohl eine marginale Änderung auch bei den verbliebenen Varianten (CaM linear, N-perm-1, N-perm-2) beobachtet werden konnte. Überraschenderweise zeigten die α Biotin scFvs mit C-terminal permutierten CaM-Linkern eine Zunahme der Fluoreszenzintensität unter Einfluss von M13-Peptid. Die gleiche Tendenz zeigte sich bei drei α CD4 scFv-CaM-Fusionen

5 ERGEBNISSE

(Abb. 5.10, vierte Reihe) (M-perm-1, C-perm-1, C-perm-2), wobei das Ausmaß der Signalzunahme sogar noch größer war als im Fall der α Biotin scFvs. Die Integration der verschiedenen CaM-Linker in den α FITC scFv resultierte in keinem Fall in einem schaltbaren scFv-Fragment (Abb. 5.10, fünfte Reihe).

Basierend auf den Ergebnissen der ersten Analyse kann festgehalten werden, dass eine Übertragung des Calmodulin/M13-Peptid-basierten Systems auf andere scFv-Spezifitäten möglich ist, da in 4 von 5 getesteten Spezifitäten durch Integration ausgewählter Calmodulin-Linker schaltbare scFvs generiert werden konnten.

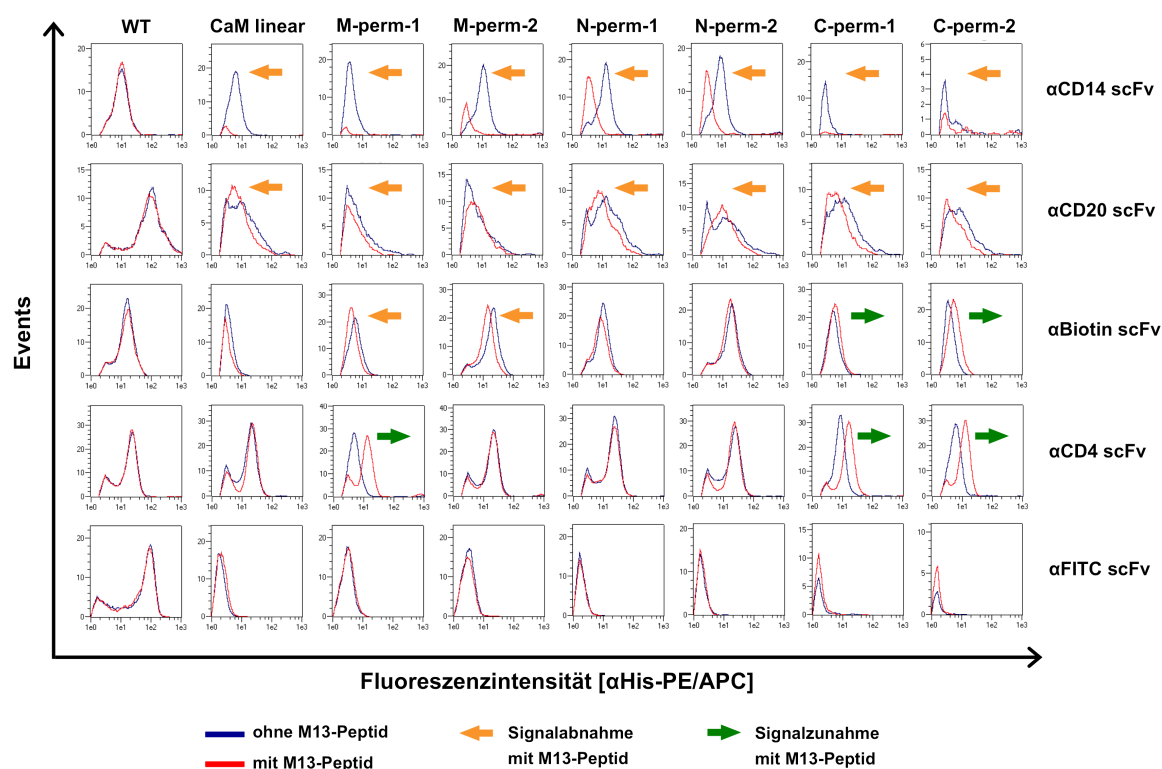


Abb. 5.10: Identifizierung schaltbarer scFv-Calmodulin-Varianten mittels kompetitiver PBMC-Färbung
 Humane Blutzellen (PBMC) wurden mit scFv-haltigen Periplasmaüberständen aus *E. coli* gefärbt. Die Menge gebundener scFv-CaM-Varianten unter zwei verschiedenen Bedingungen (blaue Graphen: Bindung unter Einfluss von Calcium; rote Graphen: Bindung unter Einfluss von Calcium und M13-Peptid) wurde verglichen. Peptidabhängige Änderungen der Fluoreszenzintensität sind durch orange (Signalabnahme) und grüne (Signalzunahme) Pfeile kenntlich gemacht. Der Nachweis gebundener Antikörperfragmente erfolgte mit α His-PE (α CD14 scFv, α CD20 scFv, α Biotin scFv, α CD4 scFv) oder α His-APC (α FITC scFv) (Verdünnung 1:11). Tote Zellen wurden durch Färbung mit Propidiumiodid ausgeschlossen. Die Analyse erfolgte am MACSQuant® Analyzer 10, wobei jeweils 10.000 Zellen pro Probe vermessen wurden.

5.4.3 Reinigung und Intaktmassbestimmung der α CD14, α Biotin und α CD4 scFv-Calmodulin-Varianten

Im Anschluss an die erste Charakterisierung des peptidabhängigen Bindungsverhaltens der verschiedenen scFv-Varianten erfolgte die Expression der α CD14, α Biotin und α CD4 scFv-Fusionen im 500 mL-Maßstab und deren Reinigung analog zu den scFv D1.3-Varianten (vgl.

5 ERGEBNISSE

5.3.1). Die Reinheit der dialysierten Eluate der α CD14 und α CD4 scFv-Klone wurde mittels SDS-PAGE bestimmt (siehe Abb. 5.11). Es konnten nur sehr geringe Verunreinigungen (Laufhöhe bei ca. 12,5 kDa und bei 25 kDa) festgestellt werden, die für den weiteren Verlauf der Experimente als unkritisch eingestuft wurden. Des Weiteren wiesen die verschiedenen scFv-Varianten innerhalb einer Spezifität, wie auch die D1.3 scFv-Klone, ein unterschiedliches Laufverhalten auf, was vor allem bei den α CD4 scFv-Fusionen beobachtet werden konnte. Auch hier zeigten Varianten mit ähnlichen Permutationsstellen des Calmodulin ein nahezu identisches Migrationsverhalten. Die α Biotin scFv-Fusionen konnten aufgrund geringer Ausbeuten und folglich niedriger Proteinkonzentrationen der Eluate nicht auf ihre Reinheit hin analysiert werden.

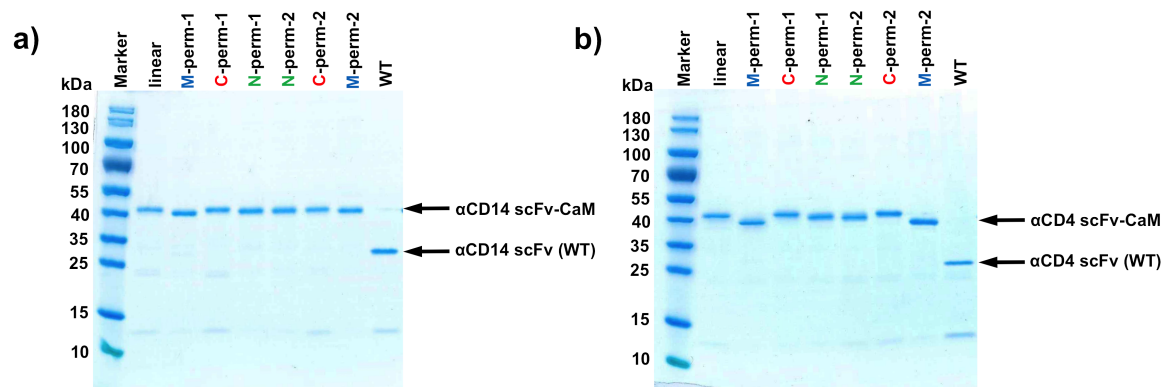


Abb. 5.11: Qualitätskontrolle gereinigter α CD14 und α CD4 scFv-Varianten mittels SDS-PAGE

Es wurde jeweils 1 μ g der gereinigten **a)** α CD14 scFv-Varianten bzw. **b)** α CD4 scFv-Varianten auf ein Tris-Glycin-Gradientengel (4–20 %) aufgetragen. Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blau G250 angefärbt.

Zur Überprüfung des Molekulargewichts der gereinigten α CD14 und α CD4 scFv-Varianten wurden die Proben, wie zuvor die D1.3 scFv-Klone (vgl. 5.3.1), mittels Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC/MS) analysiert. Laut Chromatogramm der LC/MS-Analyse lagen die gereinigten scFvs nicht in homogener Form vor. In Abb. 5.12 ist exemplarisch das Chromatogramm der Intaktmassebestimmung der α CD4 scFv-M-perm-2-Variante dargestellt. Es konnten ausnahmslos bei allen untersuchten Klonen kurz hintereinander auftretende Peaks beobachtet werden. Der erste Hauptpeak stimmte jeweils mit dem mittels *ExPASy Bioinformatics Online Tool* ermittelten Wert für vollständig prozessierten scFv überein (siehe Tab. 5.3). Die darauffolgenden Peaks unterschieden sich jeweils um ca. 180 Da, welches vom Molekulargewicht ungefähr einer Aminosäure entspricht. Dies lässt vermuten, dass es sich bei den größeren Varianten um scFvs handelt, bei denen das Signalpeptid unvollständig abgespalten wurde. Dies konnte bei Expression im pOPE-System schon mehrfach beobachtet werden, sollte jedoch keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften des scFvs haben (Dübel *et al.*, 1992). Bei den D1.3 scFv-Fusionen hingegen wurde das Signalpeptid vollständig abgespalten. Aufgrund der geringen Ausbeuten der α Biotin scFv-Klone war eine massenspektrometrische Analyse der gereinigten scFvs nicht möglich.

5 ERGEBNISSE

Tab. 5.3: Intaktmassebestimmung gereinigter α CD14 und α CD4 scFv-Varianten

Variante	Masse laut LC/MS [Da]*	Masse laut ExpASY [Da]
α CD14 scFv – WT	29.822,6	29.828,0
α CD14 scFv – CaM linear	44.752,5	44.757,5
α CD14 scFv – CaM N-perm-1	45.010,2	45.015,7
α CD14 scFv – CaM N-perm-2	45.010,3	45.015,7
α CD14 scFv – CaM M-perm-1	45.011,0	45.015,7
α CD14 scFv – CaM M-perm-2	45.011,5	45.015,7
α CD14 scFv – CaM C-perm-1	45.010,8	45.015,7
α CD14 scFv – CaM C-perm-2	45.011,2	45.015,7
α CD4 scFv – WT	28.643,4	28.646,4
α CD4 scFv – CaM linear	44.631,9	44.633,1
α CD4 scFv – CaM N-perm-1	44.889,8	44.891,4
α CD4 scFv – CaM N-perm-2	44.889,8	44.891,4
α CD4 scFv – CaM M-perm-1	44.888,8	44.891,4
α CD4 scFv – CaM M-perm-2	44.889,7	44.891,4
α CD4 scFv – CaM C-perm-1	44.888,7	44.891,4
α CD4 scFv – CaM C-perm-2	44.891,8	44.891,4

* Masse des Hauptpeaks (korrekt prozessiert)

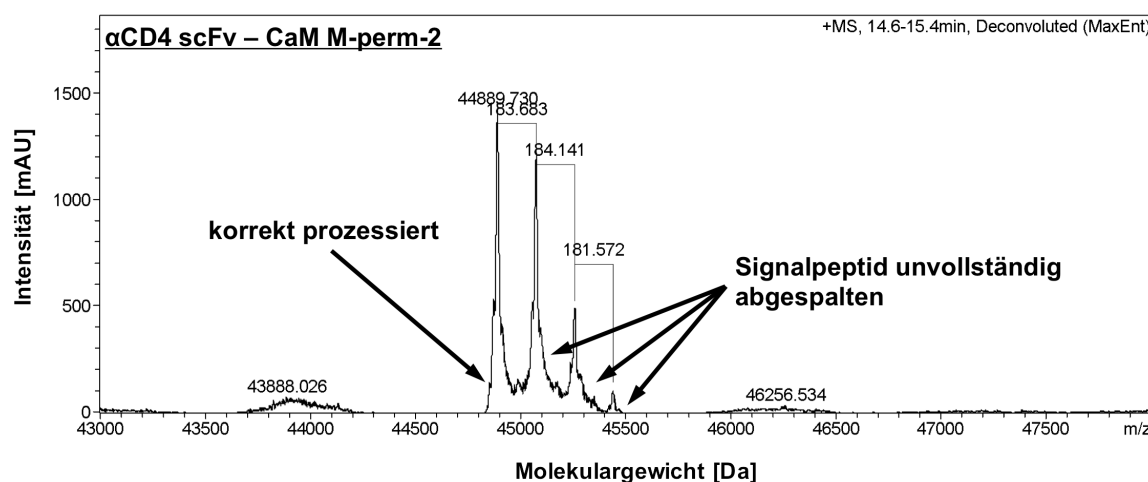


Abb. 5.12: Intaktmassebestimmung der α CD4 scFv-CaM M-perm-2-Variante

Dargestellt ist ein Chromatogramm der LC/MS-Analyse der α CD4 scFv-CaM M-perm-2-Variante. Die Intensität (in mAU) ist gegen das Molekulargewicht (in Da) aufgetragen, wobei auf den Bereich zwischen 43 und 48 kDa fokussiert worden ist.

5.4.4 Verifizierung des affinitätsmodulierenden Effekts des M13-Peptids auf α CD14, α Biotin und α CD4 scFv-Calmodulin-Varianten

Im Anschluss an die Reinigung erfolgte die Verifizierung der Ergebnisse der PBMC-Färbungen, die in Vorversuchen mit scFv-haltigen Periplasmaüberständen gewonnen worden waren (vgl. 5.4.2). Die Färbungen wurden jeweils innerhalb einer Spezifität mit gleichen scFv-Titern durchgeführt (siehe Tab. 5.4), wobei darauf geachtet wurde, dass die WT-Kontrollen mit molar vergleichbaren Titern gefärbt wurden.

Tab. 5.4: Verwendete Titer für kompetitive PBMC-Färbungen mit gereinigten scFvs

<i>Spezifität</i>	<i>Titer CaM-Varianten [$\mu\text{g/mL}$]</i>	<i>Titer WT [$\mu\text{g/mL}$]</i>
α CD14 scFv	10	6,6
α Biotin scFv	1	0,64
α CD4 scFv	1	0,64

Die α CD14 scFv-CaM-Fusionen zeigten, wie bereits im Vorversuch, eine hohe peptidabhängige Abnahme des Fluoreszenzsignals (Abb. 5.13, erste Reihe). Im Vorversuch konnte teilweise ein kompletter Verlust des Signals beobachtet werden (vgl. Abb. 5.10, erste Reihe, CaM linear und M-perm-1). Dies lässt sich jedoch darauf zurückführen, dass der scFv-Titer in den kruden Periplasmaüberständen geringer war als der hier gewählte Titer. Dadurch fiel das Ausgangssignal niedriger aus, wodurch ein kompletter Verlust des Bindungssignals unter Einfluss von M13-Peptid zu erwarten war. Auch im Fall der α Biotin scFv-Varianten (Abb. 5.13, zweite Reihe) konnten die Ergebnisse der Vorversuche bestätigt werden. Allerdings konnte nun für alle fünf Linkervarianten eine deutliche peptidabhängige Änderung des Signals beobachtet werden, wohingegen im Vorversuch bei drei Varianten (CaM linear, N-perm-1, N-perm-2) nur marginale Unterschiede beobachtet wurden. Die gereinigten α CD4 scFv-CaM-Varianten (Abb. 5.13, dritte Reihe) verhielten sich größtenteils ebenso wie im Vorversuch. Jedoch konnte eine Variante identifiziert werden (M-perm-2), die im gereinigten Zustand eine leichte Abnahme der Bindung unter Einfluss von M13-Peptid zeigte, wohingegen bei den restlichen schaltbaren α CD4 scFv-CaM-Fusionen eine peptidabhängige Zunahme der Bindungsstärke beobachtet wurde. Dies war insofern überraschend, als dass der Klon mit M-perm-1-Linker sich genau entgegengesetzt verhielt, obwohl aufgrund der ähnlichen Permutationsstelle ein vergleichbares Schaltverhalten zu erwarten gewesen wäre.

Abb. 5.14 gibt einen Überblick über das Ausmaß der peptidabhängigen Schaltbarkeit der verschiedenen scFv-Varianten. Als Maß wurde das Verhältnis der medianen Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Färbungen zueinander bestimmt, wofür der jeweils höhere Wert durch den jeweils niedrigeren Wert dividiert wurde. Die α CD14 scFv-Varianten (Abb. 5.14a) wiesen im Vergleich zu den α CD4 (Abb. 5.14c) und α Biotin (Abb. 5.14b) scFv-Fusionen das höchste Maß der Schaltbarkeit auf. Bei spezifitätenübergreifendem Vergleich der verschiedenen Linkervarianten konnte beobachtet werden, dass die mittig und C-terminal permutierten Linker in scFvs mit der höchsten Änderung des Bindungssignals resultierten. Die

5 ERGEBNISSE

N-terminal und nicht permutierten Linker bewirkten den geringsten Effekt, womit wiederum gezeigt werden konnte, dass die mittig und C-terminal permutierten Varianten zu bevorzugen sind (vgl. 5.3.2).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Calmodulin-Linker basierte System auf scFvs verschiedenster Spezifitäten übertragbar ist. Ferner ist die Integration C-terminal und mittig permutierter Linker gegenüber der Nutzung von Wildtyp-Calmodulin und N-terminal permutierten Linkern zu bevorzugen.

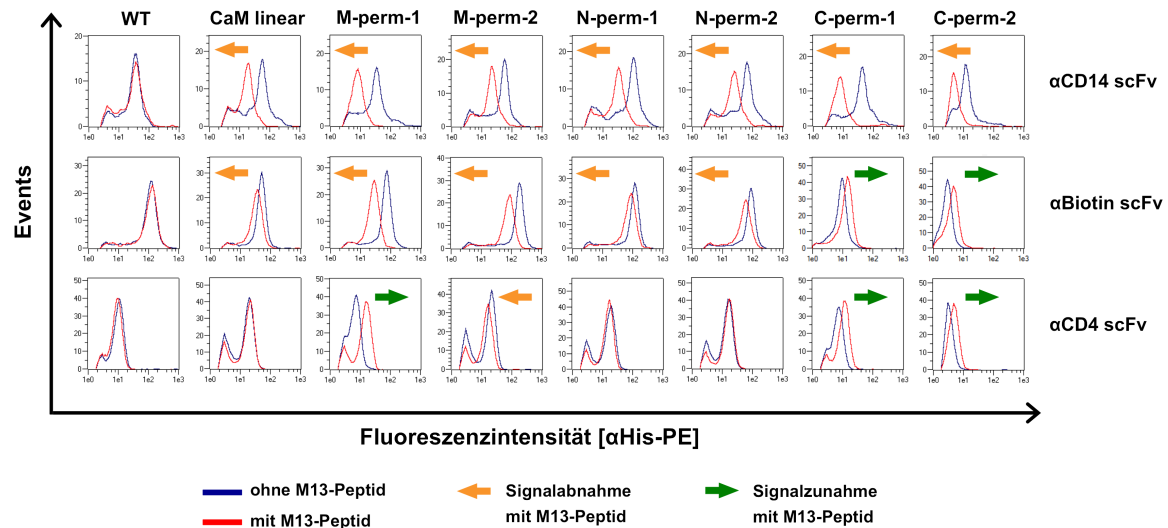


Abb. 5.13: Verifizierung des affinitätsmodulierenden Effekts des M13-Peptids auf αCD14, αBiotin und αCD4 scFv-Calmodulin-Varianten

Humane Blutzellen (PBMC) wurden mit gereinigten scFvs gefärbt. Die Menge gebundener scFv-CaM-Varianten unter zwei verschiedenen Bedingungen (blaue Graphen: Bindung unter Einfluss von Calcium; rote Graphen: Bindung unter Einfluss von Calcium und M13-Peptid) wurde verglichen. Peptidabhängige Änderungen der Fluoreszenzintensität sind durch orange (Signalabnahme) und grüne (Signalzunahme) Pfeile kenntlich gemacht. Der Nachweis gebundener Antikörperfragmente erfolgte mit αHis-PE (Verdünnung 1:11). Tote Zellen wurden durch Färbung mit Propidiumiodid ausgeschlossen. Die Analyse erfolgte am MACSQuant® Analyzer 10, wobei jeweils 10.000 Zellen pro Probe vermessen wurden. Die Ergebnisse stammen von einem repräsentativen Experiment (αCD14, αCD4 [n=6]; αBiotin [n=3]).

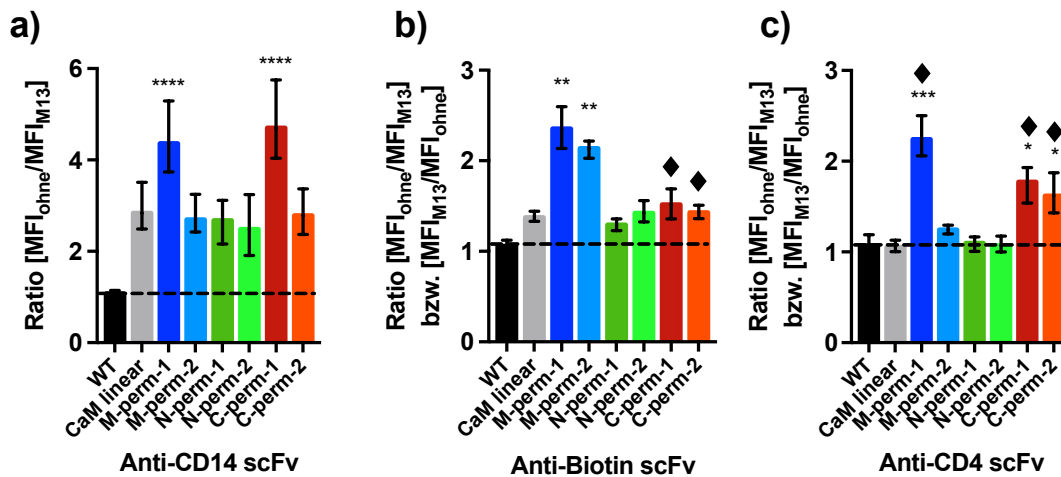


Abb. 5.14: Überblick über das Ausmaß der peptidabhängigen Schaltbarkeit verschiedener α CD14, α Biotin und α CD4 scFv-Calmodulin-Varianten

Zur vergleichenden Darstellung des Ausmaßes der peptidabhängigen Schaltbarkeit verschiedener α CD14 scFvs (**a**), α Biotin scFvs (**b**) und α CD4 scFvs (**c**) in Abhängigkeit des verwendeten Linkers wurde die Ratio der medianen Fluoreszenzintensitäten (MFI) der α His-PE-Färbungen der verschiedenen Pufferbedingungen bestimmt (MFI_{ohne}: ohne M13-Peptid; MFI_{M13}: mit M13-Peptid). Hierbei wurde der jeweils höhere Wert stets durch den jeweils niedrigeren Wert dividiert. Varianten, die eine peptidabhängige Zunahme des Bindungssignals zeigen sind mit einem schwarzen Rhombus markiert. Es wurde jeweils der Mittelwert aus 6 bzw. 3 Experimenten (α CD14, α CD4 [n=6]; α Biotin [n=3]) bestimmt, wobei die Fehlerbalken die Spannweite darstellen. Die statistische Analyse erfolgte mittels GraphPad Prism 7. Der jeweilige WT wurde als Vergleichswert verwendet (Kruskal-Wallis Test mit *Dunn's multiple comparison post-hoc test*; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

5.5 Identifizierung weiterer affinitätsmodulierender Calmodulin-Bindepeptide

Calmodulin besitzt als Regulator einer Vielzahl von Prozessen zahlreiche Bindepartner (Crivici & Ikura, 1995). Zur Evaluierung, ob weitere Calmodulin-Bindepeptide oder Mutanten des M13-Peptids ebenfalls einen affinitätsmodulierenden Effekt auf die scFv-CaM-Fusionen haben, wurde ein Peptid-Screening durchgeführt. Zum einen wurden 38 verschiedene mutierte Varianten des M13-Peptids analysiert, unter anderem Aminosäureaustauschmutanten, die eine höhere Affinität für Calmodulin besitzen (Montigiani *et al.*, 1996), verkürzte Varianten sowie Kombinationen verschiedener, bereits beschriebener Varianten (Hultschig *et al.*, 2004). Zum anderen wurden 29 Peptide untersucht, die von unterschiedlichen natürlichen Calmodulin-Bindeproteinen abgeleitet wurden, wie Calcium-ATPasen (James *et al.*, 1988), Spektrin (Leto *et al.*, 1989) und Stickstoffmonoxid-Synthasen (Matsubara *et al.*, 1996). Die Analyse erfolgte mittels kompetitiver PBMC-Färbung (vgl. 5.4.2 und 5.4.4). Das vollständige Screening der kompletten Peptidbibliothek wurde mit 4 verschiedenen Linkervarianten des α CD14 scFvs (CaM linear, M-perm-2, N-perm-1, C-perm-1) und des α CD4 scFvs (CaM linear, M-perm-1, N-perm-1, C-perm-1) durchgeführt. Der Wildtyp (d.h. scFv mit [G₄S]₃-Linker) der jeweiligen Spezifität

5 ERGEBNISSE

wurde als Kontrolle verwendet, um unspezifische Effekte der Peptide auf die scFvs ausschließen zu können.

Alle getesteten Varianten des M13-Peptids zeigten affinitätsmodulierende Effekte (Abb. 5.15a), wohingegen 24 von 29 alternativen Calmodulin-Bindepeptiden in einer Änderung des Bindungssignals in mindestens einer scFv-CaM-Variante resultierten (Abb. 5.15b). scFv-CaM-Fusionen mit mittig und C-terminal permutierten CaM-Linkern besaßen den höchsten Anteil an schaltbaren scFvs, womit wiederum bestätigt werden konnte, dass diese Varianten gegenüber den N-terminal permutierten und der linearen Linkervariante zu bevorzugen sind. Die meisten Peptide zeigten einen mit M13-WT-Peptid vergleichbaren Effekt oder teilweise auch einen etwas geringeren Einfluss auf die verschiedenen scFv-Varianten.

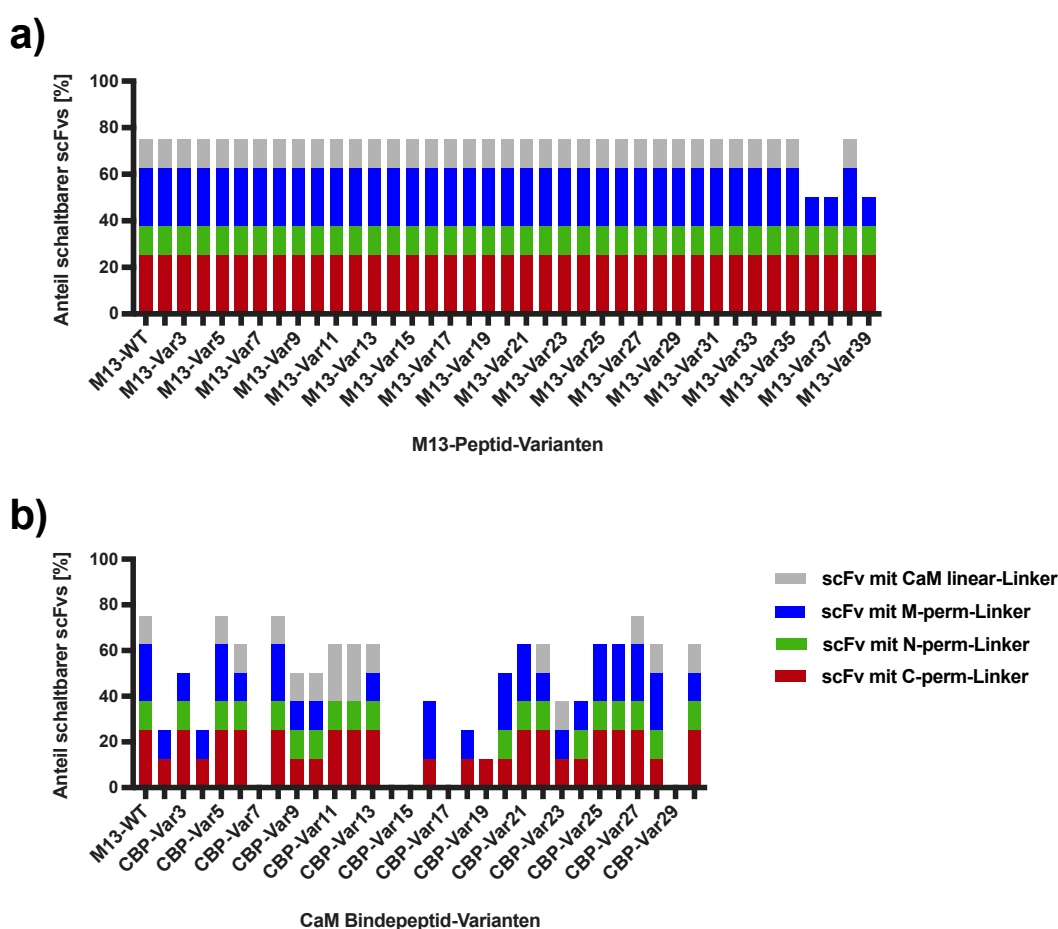


Abb. 5.15: Identifizierung weiterer affinitätsmodulierender Calmodulin-Bindepeptide – Überblick

Die kompetitive Färbung von PBMC zur Identifizierung affinitätsmodulierender Peptide wird in Abb. 5.16 genauer beschrieben. In **a)** ist der prozentuale Anteil an den getesteten scFv-Varianten dargestellt, die durch die jeweiligen M13-Peptid-Varianten im Bindungsverhalten beeinflusst wurden, wohingegen in **b)** die weiteren Calmodulin-Bindepeptid-Varianten berücksichtigt wurden. Pro Spezifität (α CD14 scFv und α CD4 scFv) wurde jeweils ein Klon jeder möglichen Permutationsstelle des Linkers analysiert (scFv mit linearem [grau], mittig permutiertem [blau], N-terminal permutiertem [grün] oder C-terminal permutiertem [rot] CaM-Linker).

5 ERGEBNISSE

Im nächsten Schritt erfolgte eine nähere Charakterisierung der Peptidkandidaten, die in einer stärkeren Schaltbarkeit der scFvs resultierten als die Wildtypvariante des M13-Peptids oder eine Umkehrung der Schaltrichtung bewirkten. Eine Übersicht über die Peptidsequenzen gibt Tab. 5.5. Es wurden alle Varianten der α CD14 scFvs, α Biotin scFvs und α CD4 scFvs untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.16 und Abb. 5.17 zusammengefasst, wobei nur die Ergebnisse der scFv-Peptid-Paarungen aufgeführt sind, die eine stärkere Änderung des Bindungssignals oder eine Umkehrung der Schaltrichtung aufwiesen. Im Fall der mittig permutierten und der linearen Variante der α CD14 scFvs führten drei bekannte Hochaffinitätsmutanten von M13 (Hultschig *et al.*, 2004; Montigiani *et al.*, 1996) zu einem höheren Signalabfall als deren Wildtypvariante (Abb. 5.16/5.17a, M13-Var5/6/7). CBP-Var8, ein Peptidderivat von Spektrin (Leto *et al.*, 1989), resultierte in einer höheren Signalabnahme in C-terminal permutierten und in der linearen scFv-CaM-Fusion der gleichen Spezifität (Abb. 5.16/5.17a, CBP-Var8). Überraschenderweise konnte bei Einsatz eines Peptids einer Calcium-transportierenden ATPase (James *et al.*, 1988) (CBP-Var16) im Fall der M-perm-2 und C-perm-2-Varianten des α CD14 scFvs eine Erhöhung des Bindungssignals beobachtet werden, wohingegen das M13-Peptid bei den gleichen CaM-Fusionen zu einer Verringerung des Signals führte (Abb. 5.16/5.17a, CBP-Var16). Ein solches gegensätzliches Verhalten konnte bei den C-terminal permutierten Varianten des α CD4 scFvs ebenfalls beobachtet werden. Hier führte das M13-Peptid zu einer Erhöhung des Signals, wohingegen der Einsatz von CBP-Var16 in einer Verringerung der Bindungsstärke resultierte (Abb. 5.16/5.17c, CBP-Var16). Zwei α Biotin scFvs (M-perm-1, M-perm-2) zeigten eine Umkehrung der Schaltrichtung in Anwesenheit von CBP-Var6 (Abb. 5.16/5.17b, CBP-Var6), bei dem es sich ebenfalls um ein Derivat der Calcium-ATPase handelt (James *et al.*, 1988). Dies konnte in gleicher Weise für die M-perm-2-Variante des α CD4 scFvs beobachtet werden (Abb. 5.16/5.17c, CBP-Var6). Interessanterweise zeigte der C-perm-1-Klon des α Biotin scFvs kein gegensätzliches Schaltverhalten bei Verwendung von CBP-Var16 (Abb. 5.16/5.17b, CBP-Var16), sondern vielmehr ein im Vergleich zum M13-Peptid weiterhin verstärkenden Effekt der Bindung. Ein ähnliches Verhalten konnte im Fall des α CD4 scFvs mit M-perm-1-Linker in Anwesenheit von CBP-Var6 beobachtet werden (Abb. 5.16/5.17c, CBP-Var6). Das Peptid CBP-Var12, abgeleitet von endothelialer Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) (Matsubara *et al.*, 1996), resultierte in den C-terminal permutierten scFv-CaM-Fusionen des α CD4 scFvs in einer weiteren Verstärkung des Bindungssignals (Abb. 5.16/5.17c, CBP-Var12). Ein weiterer unerwarteter Effekt zeigte sich bei Anwesenheit von CBP-Var10, abgeleitet vom ionotropischen Glutamatrezeptor NMDA1 (Ehlers *et al.*, 1996), welches eine Abnahme des Bindungssignals im α CD4 scFv mit linearem CaM-Linker auslöste, obwohl das M13-Peptid die Bindung nicht beeinflusste (Abb. 5.16/5.17c, CBP-Var10).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Mehrheit der getesteten Calmodulin-Bindepeptide die Bindung der scFv-CaM-Fusionen modulieren. Ferner konnten Peptidkandidaten identifiziert werden, die einen stärkeren Effekt auf die Bindung haben als das zuvor getestete M13-WT-Peptid. Interessant ist die Beobachtung, dass manche Peptide im Vergleich zum M13-WT-Peptid eine Umkehrung

5 ERGEBNISSE

der Schaltrichtung bewirken. Die besten Ergebnisse konnten mit scFv-CaM-Fusionen mit mittig und C-terminal permutierten CaM-Linkern erzeugt werden, welches wiederum zeigt, dass diese Linkervarianten gegenüber den N-terminal permutierten und linearen Linkern zu bevorzugen sind.

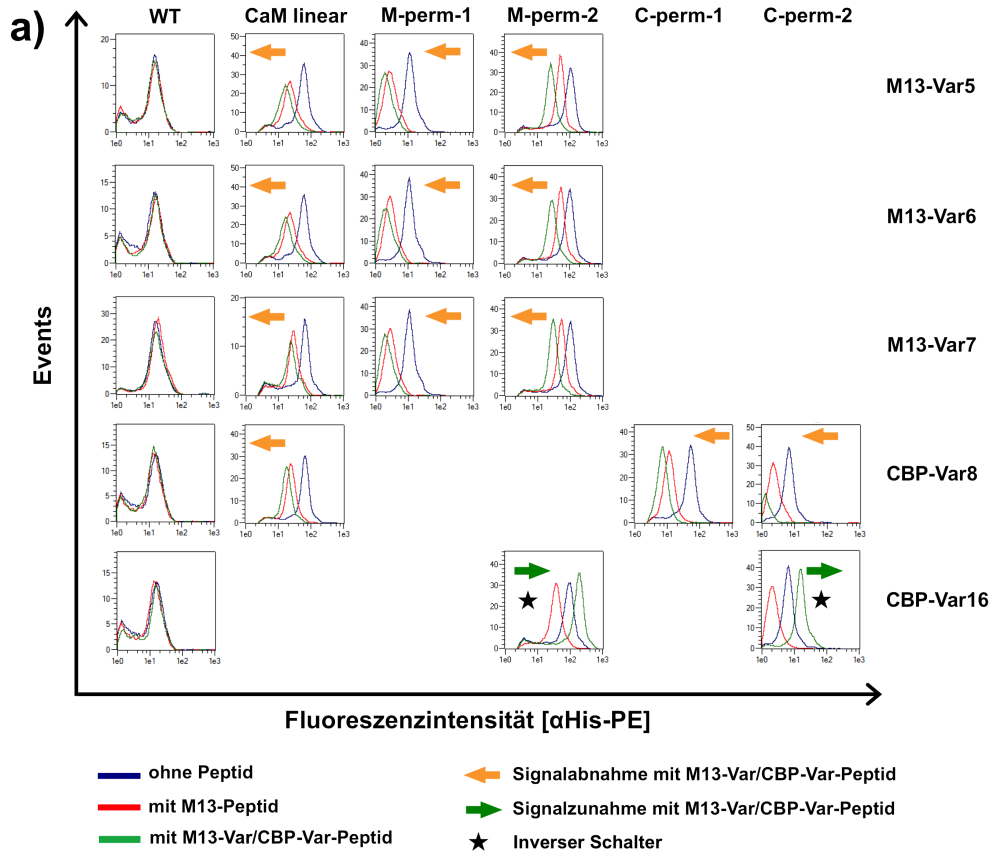


Abb. 5.16a: Identifizierung weiterer affinitätsmodulierender Calmodulin-Bindepeptide – vielversprechendste Varianten

Humane Blutzellen (PBMC) wurden mit verschiedenen gereinigten α CD14 scFvs (**a**) gefärbt. Die Menge gebundener scFv-CaM-Varianten unter drei verschiedenen Bedingungen (blaue Graphen: Bindung unter Einfluss von Calcium; rote Graphen: Bindung unter Einfluss von Calcium und M13-Peptid; grüne Graphen: Bindung unter Einfluss alternativer Calmodulin-Bindepeptide) wurde verglichen. Änderungen der Fluoreszenzintensität sind durch orange (Signalabnahme unter Einfluss alternativer Calmodulin-Bindepeptide) und grüne (Signalzunahme unter Einfluss alternativer Calmodulin-Bindepeptide) Pfeile kenntlich gemacht. Eine Umkehrung der Schaltrichtung im Vergleich zum M13-Peptid wird durch einen Stern indiziert. Der Nachweis gebundener Antikörperfragmente erfolgte mit α His-PE (Verdünnung 1:11). Tote Zellen wurden durch Färbung mit Propidiumiodid ausgeschlossen. Die Analyse erfolgte am MACSQuant® Analyzer 10, wobei jeweils 10.000 Zellen pro Probe vermessen wurden. Die Ergebnisse stammen von einem repräsentativen Experiment (n=3).

5 ERGEBNISSE

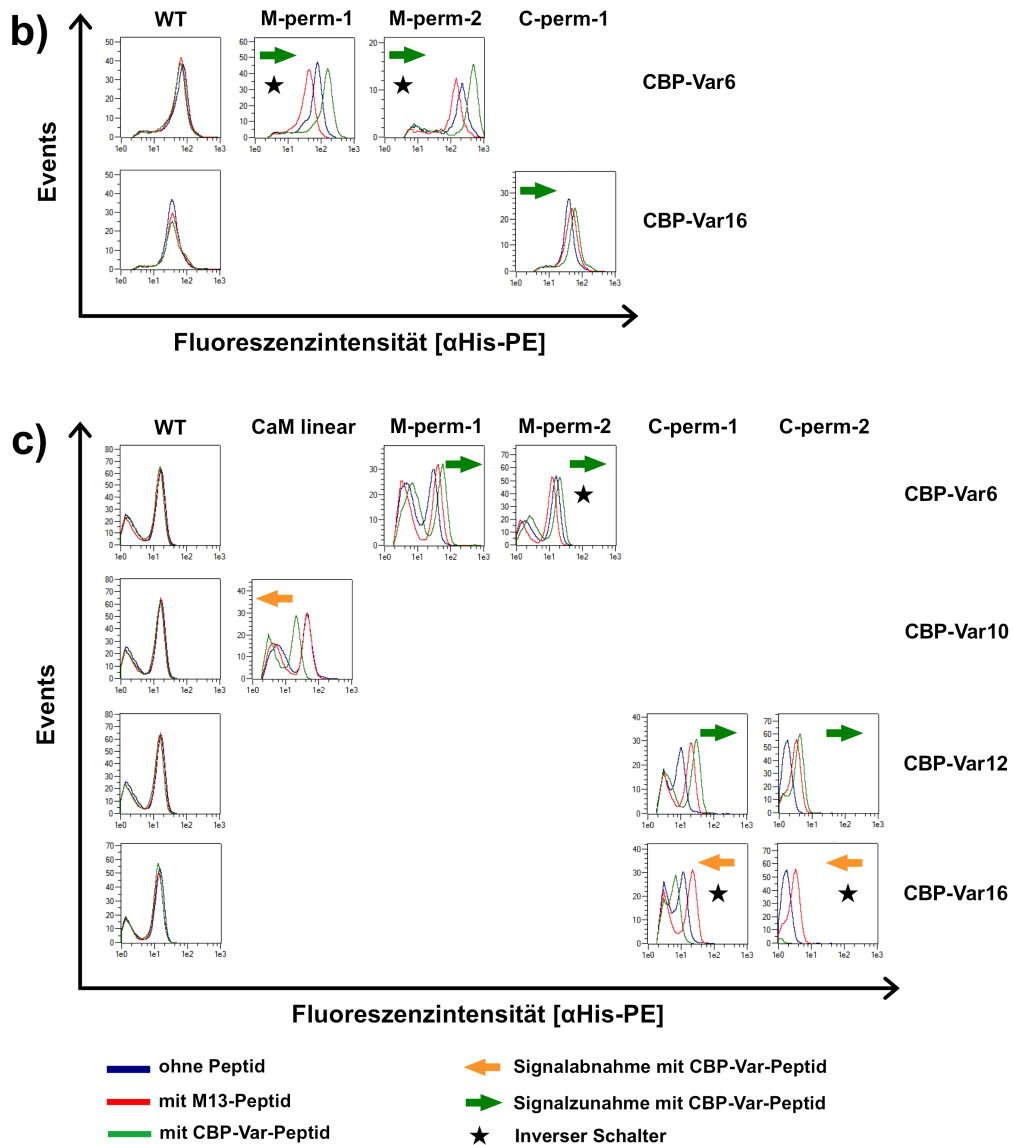


Abb. 5.16b/c: Identifizierung weiterer affinitätsmodulierender Calmodulin-Bindepeptide – vielversprechendste Varianten

Humane Blutzellen (PBMC) wurden mit verschiedenen gereinigten α Biotin scFvs (**b**) oder α CD4 scFvs (**c**) gefärbt. Die Menge gebundener scFv-CaM-Varianten unter drei verschiedenen Bedingungen (blaue Graphen: Bindung unter Einfluss von Calcium; rote Graphen: Bindung unter Einfluss von Calcium und M13-Peptid; grüne Graphen: Bindung unter Einfluss alternativer Calmodulin-Bindepeptide) wurde verglichen. Änderungen der Fluoreszenzintensität sind durch orange (Signalabnahme unter Einfluss alternativer Calmodulin-Bindepeptide) und grüne (Signalzunahme unter Einfluss alternativer Calmodulin-Bindepeptide) Pfeile kenntlich gemacht. Eine Umkehrung der Schaltrichtung im Vergleich zum M13-Peptid wird durch einen Stern indiziert. Der Nachweis gebundener Antikörperfragmente erfolgte mit α His-PE (Verdünnung 1:11). Tote Zellen wurden durch Färbung mit Propidiumiodid ausgeschlossen. Die Analyse erfolgte am MACSQuant® Analyzer 10, wobei jeweils 10.000 Zellen pro Probe vermessen wurden. Die Ergebnisse stammen von einem repräsentativen Experiment ($n=3$).

5 ERGEBNISSE

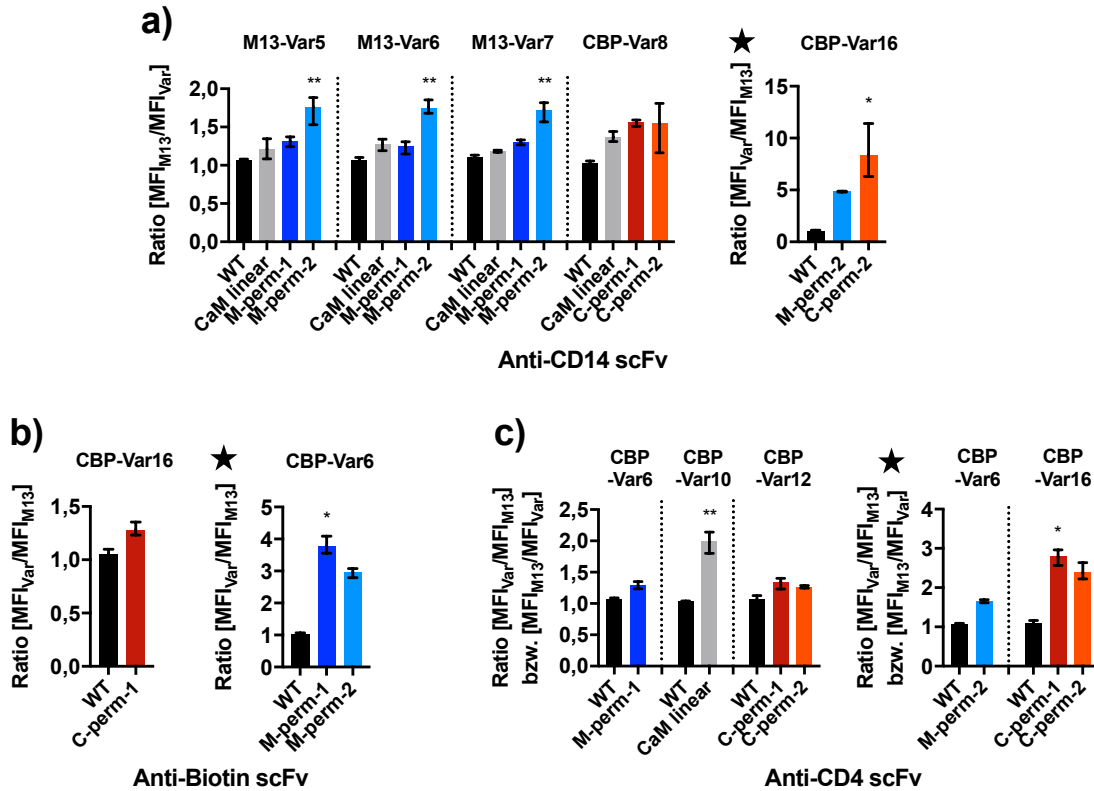


Abb. 5.17: Identifizierung weiterer affinitätsmodulierender Calmodulin-Bindepeptide – vielversprechendste Varianten (Statistik)

Zur vergleichenden Darstellung der durch M13-Peptid und weiteren Calmodulin-Bindepeptid-Varianten erzeugten Signaländerungen wurde die Ratio der medianen Fluoreszenzintensitäten (MFI) der α His-PE-Färbungen der verschiedenen Pufferbedingungen (MFI_{M13} : mit M13-Peptid; MFI_{Var} : mit M13-Var/CBP-Var) bestimmt. Der jeweils höhere Wert wurde stets durch den jeweils niedrigeren Wert dividiert. Eine Umkehrung der Schaltrichtung im Vergleich zum M13-Peptid wird durch einen großen Stern über dem jeweiligen Diagramm indiziert. Es wurde jeweils der Mittelwert aus 3 Experimenten ($n=3$) bestimmt, wobei die Fehlerbalken die Spannweite darstellen. Die statistische Analyse erfolgte mittels GraphPad Prism 7, wobei der jeweilige WT als Vergleichswert verwendet wurde (Kruskal-Wallis Test mit *Dunn's multiple comparison post-hoc test* [≥ 3 Gruppen] bzw. Mann-Whitney Test [2 Gruppen]; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Tab. 5.5: Vielversprechendste Calmodulin-Bindepeptide mit affinitätsmodulierenden Eigenschaften

Peptid ID	Aminosäuresequenz	abgeleitet von
M13 (WT), L	KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL	skMLCK (Blumenthal <i>et al.</i> , 1985)
M13 (WT), S	KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGA	skMLCK (Blumenthal <i>et al.</i> , 1985)
M13-Var5	RWKKAFIAVSAANRFKKIS	skMLCK (Montigiani <i>et al.</i> , 1996)
M13-Var6	WKKAFIAVSAANRFKKIS	skMLCK (Hultschig <i>et al.</i> , 2004)
M13-Var7	RWKKAFIAVSAANRFKKI	skMLCK (Hultschig <i>et al.</i> , 2004)
CBP-Var6	RGQILWFRGLNRIQTQIKVVFNAFS	Ca ²⁺ -ATPase (James <i>et al.</i> , 1988)
CBP-Var16	LRRGQILWFRGLNRIQTQIK	Ca ²⁺ -ATPase (James <i>et al.</i> , 1988)
CBP-Var8	KTASPWKSARLMVHTVATFNSIKE	α -Spektrin (Leto <i>et al.</i> , 1989)
CBP-Var10	KKKATFRAITSTLASSFKRRRSSK	NMDA-Rezeptor (Ehlers <i>et al.</i> , 1996)
CBP-Var12	RKKTFKEVANAVKISASLMG	eNOS (Matsubara <i>et al.</i> , 1996)

Ähnliche Sequenzen (Derivate von skMLCK und Ca²⁺-ATPase) wurden jeweils bezüglich ihrer Aminosäuresequenz ausgerichtet. Das rote, fettmarkierte „A“ hebt den Aminosäureaustausch hervor, der in der hochaffinen M13-Peptid-Variante resultiert.

5.6 Evaluierung des Schaltmechanismus der α CD14 scFv-Calmodulin M-perm-2-Variante unter Einfluss von M13-Peptid

Am Anfang dieser Arbeit stand die Hypothese, dass eine Konformationsänderung innerhalb der Linkerregion eines scFvs ausreichen sollte, um die Interaktion zwischen Antikörperfragment und Antigen zu verändern (vgl. 2.3.1) (Dübel, 2005). Zum einen könnte eine Verringerung oder Verstärkung der Antikörper-Antigen-Bindung durch Änderung der Paratopkonformation des scFvs bewirkt werden, womit der scFv als Monomer bestehen bleiben würde. Zum anderen könnte eine Änderung der Linkerkonformation die Ausbildung von scFv-Dimer- oder Multimeren begünstigen, welches ebenfalls einen Einfluss auf die Affinität des Antikörperfragments haben könnte (Holliger *et al.*, 1993; Hudson & Kortt, 1999).

Im folgenden Experiment sollte deshalb untersucht werden, ob im Fall der M13-Peptid-abhängigen Verringerung der Bindungsstärke der α CD14 scFv-CaM M-perm-2-Variante eine Dimer- oder Multimerisierung der scFv-CaM-Fusion eine Rolle spielt. Dies erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie in Abhängigkeit von M13-Peptid.

5.6.1 Präparative Größenausschlusschromatographie (SEC)

Als Vorbereitung erfolgte eine Reinigung von monomeren scFv-Fragmenten über präparative SEC, um sicherzustellen, dass für die darauffolgende analytische SEC initial nur monomerer scFv vorlag. Als Kontrolle wurde die Wildtypvariante analysiert. Nach Produktion der scFv-Fragmente im Schüttelkolbenmaßstab und nachfolgender Reinigung über Affinitätschromatographie erfolgte die Auftrennung eventuell vorhandener Mono-, Dimer- und Multimere über Größenausschlusschromatographie an einem ÄKTA-Purifier System (vgl. 4.5.2). Im Fall der Wildtypkontrolle konnte ein einzelner symmetrischer Peak im erwarteten Größenbereich beobachtet werden (Abb. 5.18a, Fraktion 28-33), sodass davon ausgegangen werden konnte, dass α CD14 scFv mit (G₄S)₃-Linker ausschließlich als Monomer vorlag. Im Vergleich dazu zeigte sich bei der α CD14 scFv-CaM-Fusion (Abb. 5.18b) ein zweigeteilter Peak, wobei es sich beim ersten Teil (Fraktion 18-21) sehr wahrscheinlich um scFv-Dimere handelte. Der größte Teil lag jedoch in monomerer Form vor (Fraktion 23-28). Im Anschluss wurden die monomerhaltigen Fraktionen vereinigt, aufkonzentriert und gegen 1× TBS (pH 7,4) dialysiert.

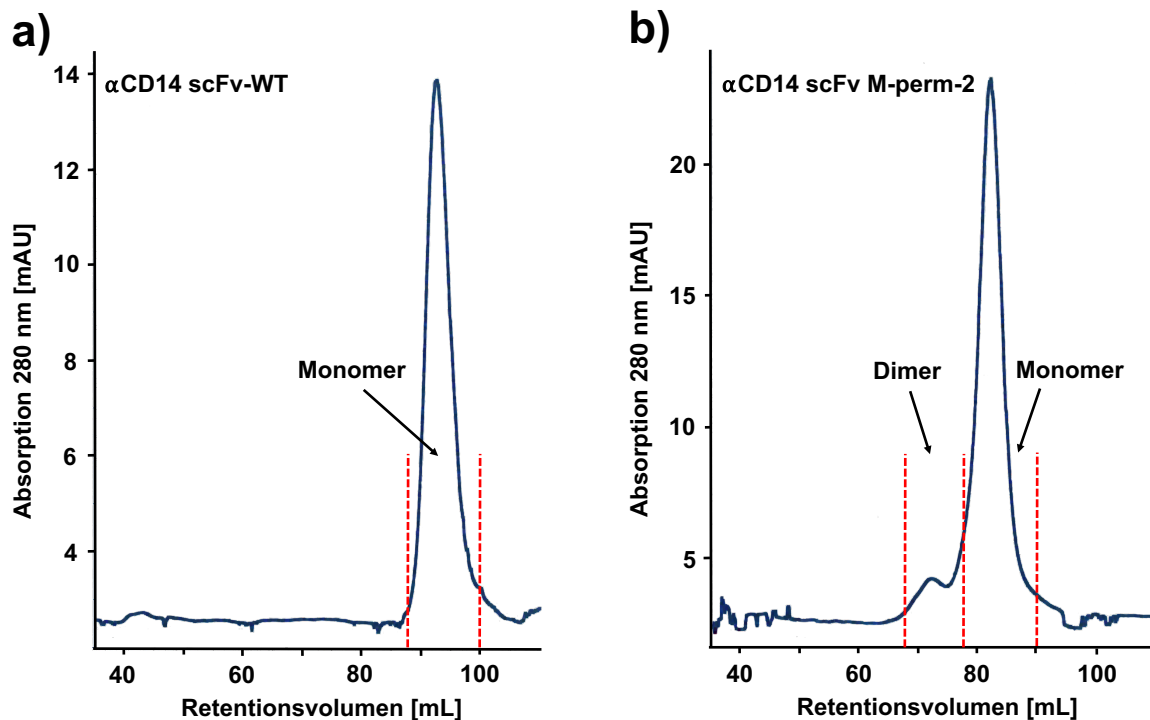


Abb. 5.18: Präparative Größenausschlusschromatographie (SEC) von α CD14 scFv-CaM M-perm-2 und α CD14 scFv-WT

Die Reinigung von monomeren scFv-Fragmenten erfolgte über eine selbstgepackte Säule (Material: Superdex™ 200). Initial wurden 0,56 mg (WT, a) bzw. 1,5 mg (M-perm-2, b) scFv aufgetragen und mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL min^{-1} ($1\times$ PBS, pH 7,4) aufgetrennt. Es wurden Fraktionen von jeweils 2 mL aufgefangen. Gezeigt ist der Absorptionsverlauf bei 280 nm in Abhängigkeit vom Retentionsvolumen.

5.6.2 Kompetitive Färbung von PBMC mit SEC-gereinigten α CD14 scFv-Varianten

Nach erfolgreicher Reinigung der monomeren α CD14 scFv-Fragmente sollte überprüft werden, ob die schaltbaren Eigenschaften der CaM-Variante auch bei Vorliegen von reinem Monomer erhalten bleiben. Hierfür wurde eine kompetitive Färbung von PBMC mit monomeren scFvs durchgeführt. Die Färbung erfolgte nach dem bereits beschriebenen Protokoll.

Die α CD14 scFv-CaM M-perm-2-Variante zeigte, wie in den Vorversuchen, eine starke Abnahme des Fluoreszenzsignals in Anwesenheit von M13-Peptid (Abb. 5.19, M-perm-2). Auch die Wildtypkontrolle verhielt sich wie zuvor und wurde durch das Peptid in der Bindungsstärke nicht beeinflusst (Abb. 5.19, WT).

Somit scheint das initiale Vorliegen des scFvs als reines Monomer in diesem Fall keinen Einfluss auf das Schaltverhalten der CaM-Fusion zu haben. Allerdings ist es möglich, dass es durch Zugabe von Calcium und/oder M13-Peptid zu einer sekundären Dimer- oder Multimerisierung kommt, welches zu einer Änderung der Bindungsstärke führt. Diese Fragestellung wurde im folgenden Versuch evaluiert.

5 ERGEBNISSE

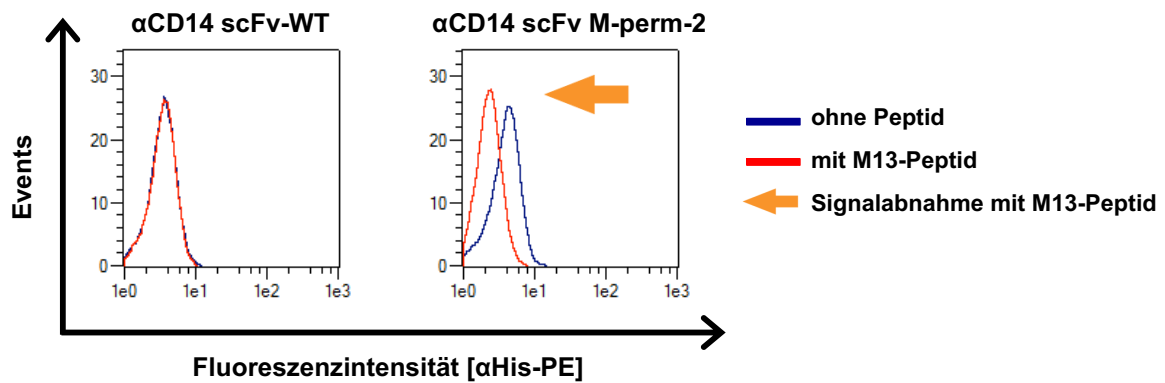


Abb. 5.19: Kompetitive Färbung von PBMC mit SEC-gereinigten α CD14 scFv-CaM M-perm-2 und α CD14 scFv-WT Monomeren

Die kompetitive Färbung von PBMC mit gereinigten scFvs wird in Abb. 5.13 genauer beschrieben. Zur Färbung wurde SEC-gereinigter α CD14 scFv-CaM M-perm-2 (Titer: 10 μ g/mL) bzw. α CD14 scFv-WT (Titer: 6,6 μ g/mL) eingesetzt.

5.6.3 Analytische Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die Analyse des potentiellen Dimer- und Multimerisierungsverhaltens der α CD14 scFv-Fragmente unter Einfluss von Calcium und M13-Peptid erfolgte mittels analytischer SEC (vgl. 4.5.3). Hierfür wurde die jeweils zu analysierende scFv-Variante mit einem 8-fach-molaren Überschuss an Calcium und einem 1,5-fach-molaren Überschuss an M13-Peptid versetzt, für 45 min bei RT inkubiert und im Anschluss über eine Yarra SEC-3000-Säule aufgetrennt. Als Kontrolle wurde der jeweilige scFv nur mit Calcium versetzt, inkubiert und analysiert. Zur Abschätzung ob es sich bei den beobachteten Peaks um Mono-, Di- oder Multimere des scFvs handelt, wurde ein Gelfiltrationsstandard vermessen, anhand dessen eine Standardgerade erzeugt wurde (Abb. 5.20).

Sowohl beim Wildtyp (Abb. 5.20, a/c) als auch der CaM-Fusion (Abb. 5.20, b/d) konnten unter verschiedenen Bedingungen (ohne/mit M13-Peptid) nahezu identische Chromatogramme beobachtet werden. Beim Wildtyp zeigte sich jeweils ein nahezu symmetrischer Peak, dessen Molekulargewicht laut Standardgerade im Bereich der erwarteten Masse des monomeren α CD14 scFv-WT-Klons lag. Für die scFv-CaM-Variante konnte ebenso jeweils ein einzelner Peak, allerdings mit leichtem *Tailing*, beobachtet werden. Dies könnte eventuell auf leichte Degradation der scFvs zurückzuführen sein. Das Molekulargewicht des Peaks lag ebenfalls im Bereich der erwarteten Masse der monomeren α CD14 scFv-CaM-Variante.

Beide getesteten scFv-Fragmente zeigten somit keine calcium- oder peptidabhängige Induktion von Dimerisierung oder Aggregation. Basierend auf diesen Ergebnissen liegt nahe, dass die peptidabhängige Änderung der Bindungsstärke der α CD14 scFv-CaM M-perm-2-Variante nicht mit der Bildung von Dimeren oder Multimeren zusammenhängt.

5 ERGEBNISSE

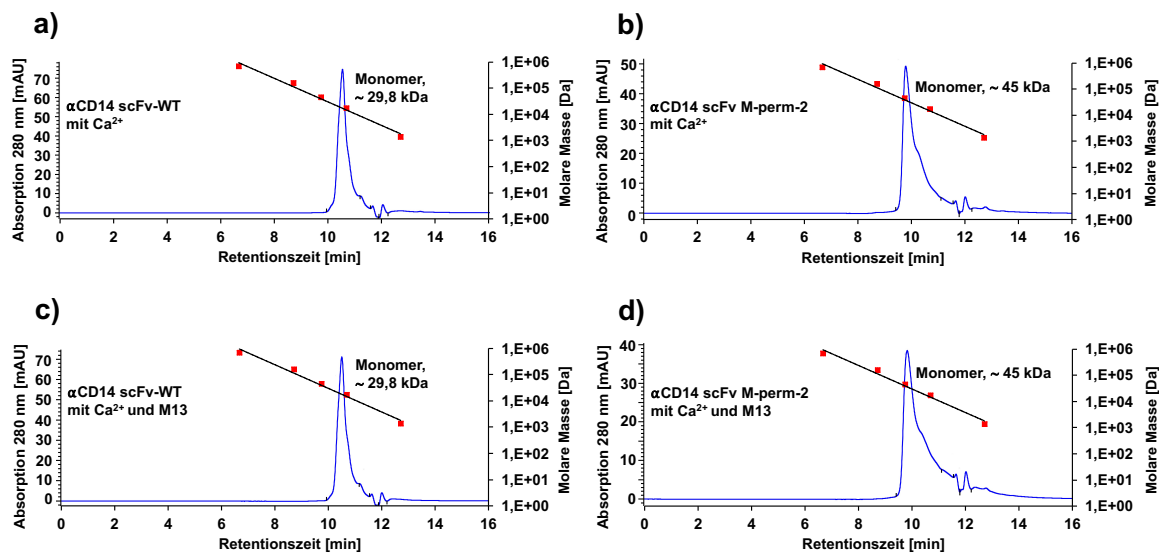


Abb. 5.20: Analytische Größenausschlusschromatographie (SEC) von α CD14 scFv-CaM M-perm-2 und α CD14 scFv-WT

Die Analyse der Konformation der scFv-Fragmente in Abhängigkeit von M13-Peptid erfolgte über eine Yarra SEC-3000-Säule. Es wurden jeweils 57 μ g (α CD14 scFv-CaM M-perm-2) bzw. 25 μ g (α CD14 scFv-WT) scFv-Fragment mit einem 8-fach-molaren Überschuss an Calcium (**a**, **b**) bzw. 8-fach-molaren Überschuss an Calcium und 1,5-fach-molaren Überschuss an M13-Peptid (**c**, **d**) aufgetragen und mit einer Fließgeschwindigkeit von $0,35 \text{ mL min}^{-1}$ aufgetrennt. Gezeigt ist der Absorptionsverlauf bei 280 nm in Abhängigkeit von der Retentionszeit. Zur Abschätzung des Molekulargewichts der einzelnen Peaks wurde ein Gelfiltrationsstandard vermessen (Thyroglobulin: 670 kDa; Bovines γ -Globulin: 158 kDa; Hühneralbumin: 44 kDa; Equines Myoglobin: 17 kDa; Vitamin B-12: 1,35 kDa).

5.7 Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_D) mittels Titration der Bindung im Gleichgewicht

In vorhergehenden Versuchen wurde beobachtet, dass die meisten scFv-CaM-Varianten bei der Färbung von PBMC in calciumhaltigem Puffer unter Einsatz vergleichbarer molarer Titer vergleichbare Fluoreszenzsignalintensitäten zur jeweiligen Wildtypvariante aufzeigten (vgl. Abb. 5.13). Dies führte zu der Annahme, dass die Bindeaffinitäten dieser scFv-CaM-Fusionen und der Wildtyp-Klone im gleichen Bereich liegen sollten.

Zur weiteren Evaluierung der Fragestellung, ob die Integration eines CaM-Linkers die initiale Affinität eines scFvs beeinflusst, wurden die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_D) der α CD14 scFv-CaM M-perm-2-Variante und der korrespondierenden Wildtypvariante mittels Titration der Bindung im Gleichgewicht bestimmt. Die Titration erfolgte durchflusszytometrisch mittels Färbung von PBMC wie in den vorhergehenden Versuchen. Zum Erreichen des Bindungsgleichgewichts erfolgte die Inkubation der scFvs auf PBMC für 45 min bei 24°C . Für den Wildtyp konnte eine initiale K_D von $284,6 \pm 20,96 \text{ nM}$ ermittelt werden, wohingegen der K_D -Wert der M-perm-2-Variante bei $427,2 \pm 22,27 \text{ nM}$ lag (Abb. 5.21, blaue Graphen). Somit

5 ERGEBNISSE

konnte ein Anstieg des K_D -Wertes um einen Faktor von 1,5 verzeichnet werden. Folglich sinkt die initiale Affinität des α CD14 scFv durch Integration des CaM-Linkers in geringem Maße. Allerdings liegen die bestimmten K_D -Werte im gleichen Bereich, womit die zuvor aufgestellte Vermutung bestätigt werden konnte. Unter Einfluss von M13-Peptid zeigte der Wildtyp keine signifikante Änderung der Affinität ($279,4 \pm 25,82$ nM). Der K_D -Wert der M-perm-2 Variante ($1758 \pm 84,9$ nM) hingegen zeigte einen peptidabhängigen Anstieg um einen Faktor von 4,1 (Abb. 5.21, rote Graphen).

Zusammenfassend kann man festhalten, dass durch Integration des CaM-Linkers ein schaltbarer scFv erzeugt werden konnte, der in Abwesenheit seines Schaltpeptids nur gering in seiner initialen Affinität beeinflusst wird.

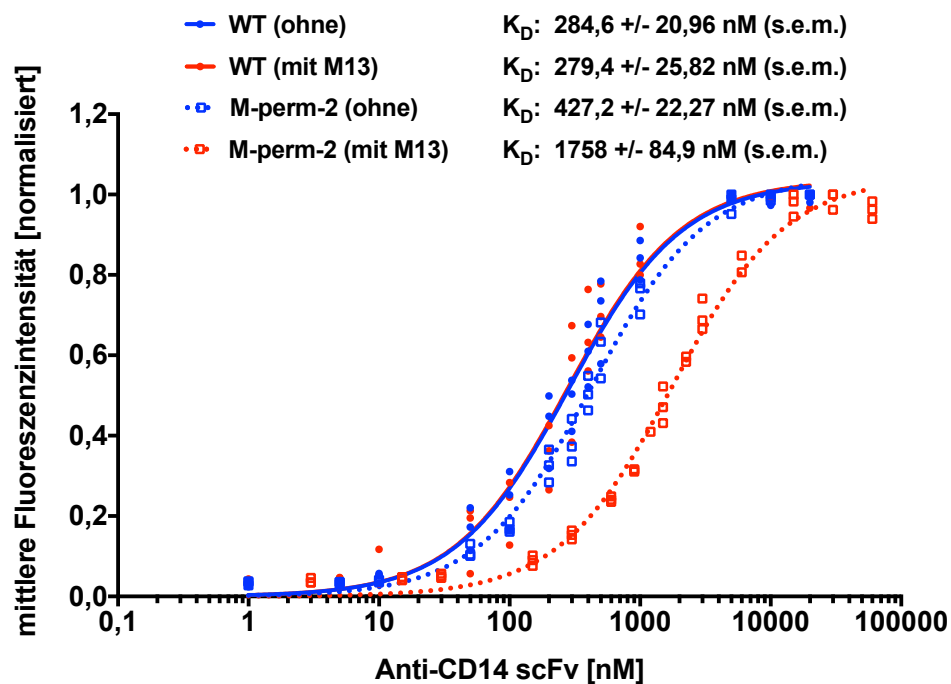


Abb. 5.21: Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_D) von α CD14 scFv-CaM M-perm-2 und α CD14 scFv-WT mittels Titration

Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_D) von α CD14 scFv-CaM M-perm-2 und α CD14 scFv-WT in calciumhaltigem Puffer (blaue Graphen) und unter Einfluss von M13-Peptid (rote Graphen) wurden durchflusszytometrisch mittels Titration und Färbung von PBMC bestimmt. Es wurden Titer im Bereich von 1 nM bis 60 μ M analysiert. Gezeigt ist die normalisierte mittlere Fluoreszenzintensität abhängig vom eingesetzten scFv-Titer von drei unabhängigen Titrationsexperimenten ($n=3$). Nur lebende FITC-positive Zellen wurden berücksichtigt. Die K_D -Werte wurden mittels GraphPad Prism 7 mit einem nichtlinearen Regressionsmodell (*one-site specific binding*) bestimmt.

6 Diskussion

6.1 Generierung eines Calmodulin/Calmodulin-Bindepeptid-basierten schaltbaren scFv-Systems

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Entwicklung eines universellen linkerbasierten Systems zur allosterischen Regulation von Antikörper-Antigen-Affinitäten in scFv-Fragmenten. Es wurden alle möglichen Calmodulin-Permutanten als Linkerregion in den lysozymbindenden scFv D1.3 eingebracht, um die optimale Orientierung des Linkers zur Generierung schaltbarer Varianten ermitteln zu können.

Bei der zirkulären Permutation kommt es zu einer intramolekularen Verlagerung des N- und C-Terminus. Diese Methode wurde bereits mehrfach zur Erzeugung schaltbarer Systeme verwendet (Baird *et al.*, 1999; Meister & Joshi, 2013; Nagai *et al.*, 2001). Insbesondere bei Fusion zweier Proteinpартner kann es von Vorteil sein, einen oder sogar beide Partner zu permutieren, um die optimale Orientierung zueinander ermitteln zu können (Guntas *et al.*, 2004).

Ursprünglich sollte die Permutation von Calmodulin über einen ungerichteten Ansatz mittels DNaseI-Verdau erfolgen (vgl. 2.5.1). Ein Vorteil dieser Methode ist der geringere Zeitaufwand gegenüber gerichteten Ansätzen. Des Weiteren kommt es durch das auf den DNaseI-Verdau folgende *Blunting* zu weiterer Diversität in der entstehenden Linkerbibliothek (Meister *et al.*, 2011). Allerdings war die Erzeugung permutierter Calmodulin-Varianten mithilfe der nach Guntas *et al.* (2004) beschriebenen Methode nicht erfolgreich. In Vorversuchen dieser Arbeit konnte nach leichter Abwandlung der Versuchsbedingungen eine Bibliothek permutierter Maltose-Bindeprotein-Varianten über DNaseI-Verdau generiert werden. Im Fall von Calmodulin war dies jedoch trotz mehrfacher Versuche nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Somit erfolgte die Permutation von Calmodulin mittels Permutagenese-PCR. Für größere Zielproteine ist diese Methode zur Erstellung einer vollständigen Permutanten-Bibliothek aufgrund der hohen Variantenanzahl weniger geeignet. Im Fall der hier verwendeten Calmodulin-Version beschränkte sich die Diversität jedoch auf 152 mögliche Varianten. Es konnten 145 von 152 möglichen Varianten als Linkerregion in den scFv D1.3 eingebracht werden (vgl. 5.1). Für die 7 verbliebenen Linkervarianten konnte entweder kein PCR-Produkt erzeugt werden oder es konnten nach Transformation in *E. coli* W3110 keine Klone mit korrektem Insert identifiziert werden. Durch Optimierung der PCR- und Ligationsbedingungen hätten die verbliebenen Klone möglicherweise noch erzeugt werden können. Da jedoch der Großteil (95,4 %) der Permutanten bereits vorlag und die erzeugte Diversität als ausreichend angesehen wurde, wurde darauf verzichtet.

6 DISKUSSION

Die Identifizierung schaltbarer scFv D1.3-CaM-Fusionen erfolgte mittels kompetitivem ELISA (vgl. 5.2). Der Großteil der permutierten CaM-Linker (139 von 145, somit 95,86 %) resultierte in schaltbaren scFvs, wobei sich das Ausmaß der Schaltbarkeit je nach Region der Permutation unterschied. Die größte M13-Peptid-abhängige Signalabnahme konnte in Varianten mit N-terminal, C-terminal und mittig permutierten CaM-Linkern beobachtet werden, wodurch sich ein eindeutiges Muster aus besonders geeigneten Permutationsstellen ergab: nahe beieinander an einer Seite der peptidgebundenen Form (vgl. Abb. 5.4). Solche Muster konnten auch in anderen Versuchen, wie der Erzeugung von Permutanten mit erhöhter katalytischer Aktivität (Qian & Lutz, 2005) oder der Ermittlung von für die Faltung essentiellen Elementen (Iwakura *et al.*, 2000) identifiziert werden. Bei Erzeugung von Lipase B-Mutanten konnte gezeigt werden, dass Permutationsstellen, die in funktionellem Enzym resultierten, hauptsächlich auf einer Seite des Enzyms zu finden waren (Qian & Lutz, 2005).

Darüber hinaus zeigten scFv D1.3-CaM-Varianten mit N-terminal, C-terminal und mittig permutierten CaM-Linkern unter peptidfreien Bedingungen ein im Durchschnitt höheres Bindungssignal als die Varianten mit geringerer Schaltbarkeit. Unter der Voraussetzung, dass alle Klone die gleiche Menge an scFv-CaM-Fusion produziert haben, könnte man somit vermuten, dass diese Varianten unter peptidfreien Bedingungen eine höhere Affinität aufweisen. Da die scFv-Konzentration in kruden Lysaten jedoch nicht bestimmt wurde, konnte dies bisher noch nicht verifiziert werden.

Besonders geeignete Permutationsstellen ergeben sich wahrscheinlich aus einer besonders günstigen Orientierung des Linkers zum scFv. Der Linker muss grundsätzlich zunächst während der Produktion die eigenständige Faltung der zwei V-Regionen des scFvs ermöglichen, ohne die eine Bindung an das Antigen nicht erfolgen kann. Außerdem muss der CaM-Linker selbst korrekt gefaltet werden, um in der Lage zu sein, mögliche Calmodulin-Bindepeptide zu binden. Schließlich muss eine peptidabhängige Konformationsänderung des CaM-Linkers erfolgen, wodurch im optimalen Fall die Konformation des gesamten scFv und folglich die Affinität zum Antigen verändert wird. Die hier identifizierten Kandidaten erfüllen die genannten Anforderungen.

Die Insertion der linearen CaM-Variante als Linkerregion resultierte in einem schaltbaren scFv D1.3, allerdings konnten die Eigenschaften durch Permutation deutlich verbessert werden. Durch Permutation anderer Proteine wurden bereits früher Varianten mit verbesserter Funktion oder katalytischer Aktivität generiert. Dazu gehören u.a. ein Immunotoxin mit gesteigerter Antitumoraktivität auf Basis eines permutierten Interleukin-4 (IL-4) (Kreitman *et al.*, 1994, 1995) und diverse Enzyme mit optimierter katalytischer Aktivität (Cheltsov *et al.*, 2001; Iwakura *et al.*, 2000; Qian & Lutz, 2005).

Ein starkes Argument für einen spezifischen Regulationsmechanismus ist die Beobachtung, dass mit Ausnahme der M-perm-2-Variante alle scFv-CaM-Fusionen ein Maximum an Signaländerung bei einem ungefähr equimolaren Verhältnis von scFv zu M13-Peptid erreichten – dies unterstützt die Hypothese, dass genau ein Molekül des Peptides spezifisch an seine Bindestelle im Linker des

6 DISKUSSION

scFv bindet um den Effekt zu bewirken, und dass diese Bindung eine genügend hohe Affinität aufweist. Ferner sollte die Titration der benötigten Calciumkonzentration pro Molekül M13-Peptid und scFv erfolgen. Calmodulin liegt in der Regel in Koordination mit 4 Calciumionen vor (Linse *et al.*, 1991), damit eine Interaktion mit M13-Peptid erfolgen kann (Ikura *et al.*, 1992). Titrationsversuche hierzu blieben jedoch erfolglos, da die Erstellung von calcium- und gleichzeitig chelatorfreiem Puffer nicht möglich war. Das verwendete Puffersystem (1× TBS) ist zwar generell calciumfrei, allerdings scheinen geringe Mengen an Calcium im verwendeten BSA-Blockpuffer vorzuliegen, die die Titrationsversuche verfälschten. In vermeintlich calciumfreiem Puffer konnten die gleichen Bindungssignale beobachtet werden wie in Puffer mit 0,4 µM zugesetztem Calciumchlorid (Daten nicht gezeigt). Da der Titrationsbereich in sehr niedrigen Konzentrationsbereichen lag kann davon ausgegangen werden, dass das verwendete BSA herstellungsbedingt nicht calciumfrei war. Eine Kontrolltitration von M13-Peptid in EDTA-haltigem Puffer zeigte hingegen, dass die Interaktion zwischen Peptid und dem CaM-Linker grundsätzlich in Abhängigkeit von Calcium erfolgt, da in Anwesenheit des Chelators keine peptidabhängige Änderung des Bindungssignals beobachtet werden konnte. Dies unterstützt weiterhin die Hypothese einer spezifischen Bindung von M13-Peptid an alle untersuchten Permutationsvarianten des Calmodulin. Allerdings wurden mit allen scFv-CaM-Varianten und der Wildtypkontrolle in EDTA-haltigem Puffer generell geringere Bindungssignale erreicht. Dies könnte möglicherweise auf Chelatierung von Kofaktoren zurückzuführen sein, welche für die Antigenbindung essentiell sind (Zhou *et al.*, 2005).

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Etablierung eines Systems zur Generierung von scFvs mit schaltbarer Affinität, welchem ein von Mutationen in den eigentlichen Antigenbindungsstellen unabhängiger Mechanismus zugrunde liegt, und welches somit eine breit anwendbare, wenn nicht sogar universelle Schaltmöglichkeit für beliebige scFv bietet. Mittels kompetitiver PBMC-Färbung wurde hier gezeigt, dass für 4 der 5 getesteten anderen scFvs 4 schaltbare Varianten erzeugt werden konnten (vgl. 5.4). Lediglich die Integration der verschiedenen CaM-Linker in den αFITC scFv resultierte in keinem Fall in einem schaltbaren scFv-Fragment (vgl. 5.4.2). Bei dem verwendeten Klon (4M5.3) handelt es sich um einen scFv mit einer extrem hohen monovalenten Affinität im femtomolaren Bereich, der durch Mutagenese und darauffolgenden Hefe-Display erzeugt wurde (Boder *et al.*, 2000; Midelfort & Wittrup, 2006). Die Antigen-Antikörper-Interaktionsfläche von 4M5.3 ist vergleichsweise klein. Sowohl V_H als auch V_L tragen zur Antigenbindung bei (Midelfort *et al.*, 2004). Das gebundene Fluorescein befindet sich in einer tiefen, hydrophoben Bindungstasche, die strukturell durch linkerbedingte Änderungen der Orientierung von V_H zu V_L weniger beeinträchtigt werden dürfte als große und flache Interaktionsflächen weiter entfernt von der Drehachse des Winkels zwischen den Domänen auf der Oberfläche des Antikörpers. Zudem könnte die initial sehr hohe Affinität Resultate bewirken, die schlicht außerhalb des linearen Messintervalls des gewählten Assays liegen, sodass ein Schalten nicht bemerkt würde, selbst wenn es stattgefunden hat.

6 DISKUSSION

Das Ausmaß der Schaltbarkeit der anderen scFv-Fragmente unterschied sich abhängig von der Spezifität und von der jeweils verwendeten CaM-Linkervariante. Die besten Ergebnisse wurden bei jeder Spezifität mit mittig und C-terminal permutierten Linkern erzielt. Linker mit ähnlichen Permutationsstellen zeigten überdies meistens ein ähnliches Verhalten in der Regulation der Bindungsstärke. Es konnte überwiegend eine M13-Peptid-abhängige Abnahme der Affinität beobachtet werden. Die Integration der C-terminal permutierten Linker resultierte allerdings in zwei Spezifitäten (α Biotin, α CD4) in scFv-Fragmenten, die eine Zunahme der Bindungsstärke unter Einfluss von M13-Peptid zeigten. Die α CD4 scFv M-perm-1-Fusion verhielt sich in ähnlicher Weise. Dieses Verhalten könnte eventuell darauf zurückzuführen sein, dass in diesen Fällen die Ausbildung der scFv-Antigen-Interaktion durch eine veränderte Paratopstruktur im peptidgebundenen Zustand begünstigt wird oder das Paratop stabilisiert wird, wodurch eine Zunahme der Affinität erfolgt. Ferner besteht die Möglichkeit, dass es unter Einfluss von M13-Peptid zu einer Bildung von scFv-Multimeren kommt. Hierbei würde die Bindungsstärke durch auftretende Aviditätseffekte steigen. Die Bildung von Multimeren wird typischerweise durch Verkürzung der Linkerregionen auf weniger als 10 Aminosäurereste begünstigt (Holliger *et al.*, 1993; Hudson & Kortt, 1999; Schmiedl *et al.*, 2006). Die beiden V-Regionen sind dadurch strukturell nicht mehr in der Lage, innerhalb des gleichen scFv-Polypeptides korrekt zueinander zu finden, sodass sie sich stattdessen mit den entsprechenden V-Domänen eines zweiten scFv-Polypeptides paaren und zwei verbundene scFv-Fragmente (*diabody*) formen. Ein Calmodulin-Linker in Anwesenheit von M13-Peptid könnte ebenfalls strukturell einen zur Verkürzung des Linkers analogen Effekt erzeugen, indem er die Fusionspunkte mit den V-Regionen näher zueinanderbringt (vgl. Abb. 2.2). Ein solcher Mechanismus konnte aber zumindestens für die M13-abhängige Affinitätssteigerung des α CD14 scFv durch Analyse der apparenten Molekülmasse in der SEC ausgeschlossen werden.

Interessanterweise konnten einige Calmodulin-Bindepeptide identifiziert werden, die je nach Spezifität und CaM-Linkervariante sowohl eine Ab- oder Zunahme des Bindungssignals erzeugten (vgl. 5.5). Einige Peptide zeigten auch einen stärkeren Modulationseffekt als das M13-Peptid. Drei Varianten der bekannten Hochaffinitätsmutante des M13-Peptids (Hultschig *et al.*, 2004; Montigiani *et al.*, 1996) bewirkten in drei α CD14 scFv-CaM-Varianten einen höheren Signalabfall als die M13-Wildtypvariante. CBP-Var6 und CBP-Var16, Peptidderivate einer Calcium-ATPase (James *et al.*, 1988), bewirkten interessanterweise eine Umkehrung der unter Einfluss von M13-Peptid beobachteten Schaltrichtung in allen der drei getesteten Spezifitäten. Dies kann wahrscheinlich darauf zurückgeführt werden, dass CBP-Var6 und CBP-Var16 einen anderen Bindemodus zum CaM-Linker besitzen als das M13-Peptid und dass sich die dadurch hervorgerufenen Konformationsänderungen voneinander unterscheiden. In NMR (*nuclear magnetic resonance*)-Spektroskopie-Studien wurde gezeigt, dass nur die C-terminale Domäne von Calmodulin mit CBP-Var16 interagiert. Infolgedessen kommt es hauptsächlich im C-terminalen Bereich zu einer Änderung der Konformation (Elshorst *et al.*, 1999). Bei der

6 DISKUSSION

Bindung von M13-Peptid hingegen sind beide CaM-Domänen beteiligt, wodurch die typisch globuläre CaM-Form entsteht (Ikura *et al.*, 1992). Daher wird wahrscheinlich in einem Fall die Interaktion zwischen scFv und Antigen begünstigt (Zunahme der Affinität), wohingegen es in der anderen Form zu einer Destabilisierung des Paratops und folglich zu einer Abnahme der Affinität kommt. Da sich die Geometrie, insbesondere der Winkel der einzelnen Untereinheiten zueinander in verschiedenen V_H/V_L-Kombinationen (d.h. verschiedenen Antikörpern) teilweise sehr stark voneinander unterscheidet (Abhinandan & Martin, 2010), ist es nicht verwunderlich, dass die affinitätsmodulierenden Effekte je nach gewählter CaM-Variante und CaM-Bindeprotein unterschiedlich ausfallen. Durch Kombination verschiedener Peptide und CaM-Linker dürfte es möglich sein, schaltbare Module für diverse weitere scFv-Spezifitäten zu identifizieren.

Abschließend konnte mittels Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten (K_D) gezeigt werden, dass der Austausch des ursprünglichen Linkers gegen den 152 Aminosäurereste großen M-perm-2-Linker die initiale Affinität des α CD14 scFvs nur im geringen Maße beeinflusst (vgl. 5.7). Durch Integration des CaM-Linkers erwarb jedoch dieser scFv die Möglichkeit, durch Peptide in seiner Affinität geschaltet zu werden. Zusammengefasst stützen alle gezeigten Daten die Hypothese eines allosterischen Effektes als Basis für die Affinitätsmodulation nach Zugabe von Schaltpeptiden.

6.2 Vorteile des Calmodulin/Calmodulin-Bindepeptid-basierten Systems

Das in dieser Arbeit etablierte linkerbasierte System zur Erzeugung von scFv-Varianten mit modulierbarer Affinität weist gegenüber bereits beschriebenen Methoden einige wesentliche Vorteile auf.

Wie bereits zu Beginn erwähnt (vgl. 2.3.1) basieren die meisten Methoden zur Generierung schaltbarer Antikörper auf der Erzeugung von Aminosäureaustauschbibliotheken und der nachfolgenden Selektion von gewünschten Antikörpervarianten mittels Phagen-Display. Die Erzeugung einer Aminosäureaustauschbibliothek erfolgt auf Basis der bekannten Sequenz des Zielklons. Anhand dieser Methodik konnten erfolgreich Antikörper generiert werden, die unter physiologischen Bedingungen pH- (Murtaugh *et al.*, 2011; Schröter *et al.*, 2015) oder calciumabhängig (Hironiwa *et al.*, 2016) ihre Affinität zum Antigen verändern. Ferner konnten Histidin-Hotspots in den CDRs pH-abhängiger Varianten identifiziert werden. Diese Erkenntnis sollte die Generierung von Histidin-Scanning-Bibliotheken weiterer Spezifitäten vereinfachen (Murtaugh *et al.*, 2011). Trotz allem muss dabei jedoch jeder Antikörperkandidat den kompletten aus Mutagenese, Selektion und Screening bestehenden Prozess individuell durchlaufen, da je nach Paratopstruktur sehr unterschiedliche Aminosäurereste eine essentielle Rolle bei Modulation der Affinität spielen können.

Eine Verbesserung des bestehenden Systems wurde durch Erzeugung einer histidinangereicherten Genbibliothek und nachfolgender *de novo*-Isolierung neuer schaltbarer Antikörperspezifitäten

6 DISKUSSION

erzielt (Bonvin *et al.*, 2015). In diesem Fall entfällt der Schritt der Mutagenese, der bei Nutzung spezifischer Sequenzen für jeden Klon individuell durchgeführt werden muss. Allerdings hat die Nutzung bereits charakterisierter Antikörperklone auch Vorteile, da z. B. Expressionsraten, Faltungseffizienzen und Paratopstrukturen bekannt sind. Bei der *de novo*-Isolierung hingegen können Klone mit gänzlich neuen Eigenschaften entstehen, wodurch eine erneute vollständige Charakterisierung unerlässlich wird.

Display-basierte Methoden sind somit sehr zeit- und arbeitsaufwendig. Bei Nutzung eines linkerbasierten Systems hingegen erfolgt die Generierung schaltbarer Varianten über einen einzigen Klonierungsschritt, sofern Linkervarianten bekannt sind, die als universelles Modul verwendet werden können.

Zudem werden die Primärsequenzen der eingesetzten Antikörper bei den vorher beschriebenen Methoden mutiert. Bei einer möglichen späteren *in vivo* Anwendung können dadurch immunogene Neoepitope entstehen, welche bei klinischer Anwendung die Entwicklung neutralisierender Antikörper verursachen können. Jede Veränderung im Paratop birgt zudem das Risiko, unerwünschte Nebenwirkungen durch *off-target*-Bindungen aufgrund von neuen Kreuzreaktivitäten oder höherer unspezifischer Bindung zu verursachen. Bei einem allosterischen Regulationsmodul, welches die kompletten Antigenbindungsregionen unangetastet lässt, ist das dagegen nicht der Fall.

Die bisher beschriebenen stimulusabhängigen Linkersysteme weisen einige Nachteile gegenüber des in dieser Arbeit entwickelten Moduls auf. Eines der bereits erwähnten Systeme beruht auf elastinartigen Polypeptiden. Diese besitzen die Eigenschaft, temperaturabhängig ihre Konformation zu verändern (Urry, 1997). Mithilfe thermisch abhängiger Peptide konnten Strategien zur Reinigung von Proteinen (Chilkoti & Meyer, 1999) und gezielter Akkumulation von therapeutisch wirksamen Konjugaten in Tumoren durch lokale Hyperthermie (McDaniel *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2001) entwickelt werden. Durch Integration elastinbasierter Linker wurden scFvs generiert, die bei steigender Temperatur eine erhöhte Dissoziationsrate vom Antigen zeigten. Bei Raumtemperatur hingegen wiesen sie mit der Wildtypkontrolle vergleichbare Affinitäten auf. Eine signifikante Modulation der Affinität erfolgte jedoch erst bei relativ hohen Temperaturen (ab 50 °C) (Megeed *et al.*, 2006), welches kritisch für eine Vielzahl von Anwendungen ist – einige Antikörper-V-Regionen beginnen bei diesen Temperaturen bereits zu denaturieren.

Eine andere Strategie beruht auf der Integration einer Calmodulin-M13-Peptid-Fusion in die Linkerregion eines scFvs, wodurch ein calciumabhängiger scFv erzeugt werden konnte (Kobatake *et al.*, 2012). Die Affinität der scFv-CaM-M13-Fusion nimmt mit steigender Calciumkonzentration zu, wodurch die Dissoziation von gebundenem Antikörper durch Zugabe von Chelatoren wie EDTA erfolgen kann. Diese chelatierenden Agenzien könnten in manchen Anwendungen störend sein. Überdies würde eine therapeutische Anwendung durch die im Körper vorherrschende und gut regulierte Calciumkonzentrationen stark eingeschränkt. Der entscheidende Vorteil des in dieser Arbeit etablierten Systems im Hinblick auf zukünftige

6 DISKUSSION

therapeutische Anwendungen liegt somit in seiner Funktionalität unter konstanten und physiologischen Calciumkonzentrationen, da die Modulation der Affinität durch Zugabe von freiem Peptid erfolgt.

Darüber hinaus wurde bisher für keinen der oben genannten Ansätze gezeigt, dass eine universelle Übertragung auf scFv-Fragmente anderer Spezifitäten möglich ist.

Ferner wurde im von Kobatake *et al.* (2012) beschriebenen System natives Calmodulin als Linkerregion verwendet. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass für Spezifitäten, in denen die entsprechende lineare Variante keinen bzw. einen nur geringen affinitätsmodulierenden Effekt zeigte, durch Integration permutierter Varianten dennoch schaltbare scFv-Fusionen erzeugt werden konnten. Zum anderen konnte mit ausgewählten permutierten Varianten ein stärkerer Effekt erzielt werden als mit nativem CaM. Es wurde aber auch deutlich, dass es unter den untersuchten CaM-Linkervarianten keinen einzelnen universell einsetzbaren CaM-Linker gibt, welcher in jeder möglichen V_H/V_L bzw. V_L/V_H -Kombination in gleich schaltbaren scFv-Fusionen resultiert. Allerdings dürfte das hier beschriebene funktionelle Screening permutierter Varianten in Kombination mit verschiedenen Calmodulin-Bindepeptiden die Identifizierung funktioneller Module für eine Vielzahl von Spezifitäten ermöglichen, ohne Kenntnisse über die Paratopstruktur haben zu müssen oder diese zu mutieren.

Im Bereich der Zellseparation und reversiblen Zellfärbung könnten Antikörper mit modulierbarer Affinität ebenfalls vorteilhaft sein. Die magnetische Zellseparation (MACS, *magnetic activated cell sorting*) (Miltenyi *et al.*, 1990) wird zur Isolierung bestimmter Zellpopulationen verwendet. Im Anschluss können angereicherte Zellen genauer analysiert oder kultiviert werden. Die Separation erfolgt mithilfe von Antikörpern, die an Oberflächenmarker der Zielzellen binden. Die Antikörper sind meistens über einen kurzen Linker an Magnetpartikel konjugiert, womit eine Anreicherung über magnetische Säulen möglich ist. Oft ist nach der Separation eine Ablösung der Magnetpartikel von den Zielzellen wünschenswert. Gegenwärtig erfolgt dies z. B. über enzymatischen Verdau. Der Antikörper wird über Dextraneinheiten an Magnetpartikel verknüpft, wodurch die Trennung über Verdau mit spezifischen Dextranasen erfolgen kann (Miltenyi, 1998). Eine andere Methode nutzt die Interaktion zwischen Avidin und Biotin (Weber *et al.*, 1989). Im ersten Schritt wird die Zielzelle mit einem biotinylierten Primärantikörper markiert. Danach erfolgt eine sekundäre Markierung mit gegen Biotin gerichteten Antikörper-Magnetpartikel-Konjugaten. Nach der Zellseparation erfolgt die Trennung der Interaktion zwischen Sekundärantikörper und biotinyliertem Primärantikörper. Dies kann beispielsweise durch Zugabe von freiem Streptavidin geschehen, welches eine hochaffine Interaktion mit dem Biotinrest eingeht und dadurch den Sekundärantikörper verdrängt, geschehen. Alternativ kann die Dissoziation durch Zugabe von freiem Biotin erfolgen, welches an den gegen Biotin gerichteten Sekundärantikörper bindet und dadurch die Interaktion zwischen Primär- und Sekundärantikörper stört (Dose & Brieden, 2014). Bei diesem System ist eine chemische Modifikation (d.h.

Biotinylierung) des Primärantikörpers unerlässlich. Dies ist oft zeitaufwendig und teilweise mit hohem Verlust von Zielprotein verbunden.

Im Gegensatz dazu kann eine scFv-CaM-Fusion direkt nach Produktion und Aufreinigung ohne weitere Modifikationen verwendet werden. Darüber hinaus erfolgt bei Nutzung einer scFv-CaM-Fusion als Primärantikörper oder Direktkonjugat (d.h. direkt an Magnetpartikel gekoppelt) eine vollständige Ablösung der Antikörperfragmente und Magnetpartikel von der Zelle, wohingegen bei den enzymatischen oder chemisch basierten Methoden Proteinreste auf der Zelle zurückbleiben und dort gegebenenfalls zu unerwünschten Effekten, wie z. B. einer Stimulierung durch Rezeptor-Crosslinking, führen können (Shearer *et al.*, 1973).

6.3 Zukünftige Ansätze zur weiteren Verbesserung des Calmodulin/Calmodulin-Bindepeptid-basierten Systems

Es bestehen zahlreiche Möglichkeiten, das in dieser Arbeit etablierte auf Calmodulin und CBP-Peptid-basierte System zu optimieren oder für bestimmte Anwendungen anzupassen.

Eine Modifizierung der permutierten Calmodulin-Linker könnte zu einer weiteren Verbesserung der Interaktion zwischen Calmodulin und Peptid beitragen. Dies könnte durch Addition, Deletion oder Substitution von Aminosäureresten erfolgen. Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion ganzer Aminosäureabschnitte zu einer Verbesserung von Enzymaktivitäten führen kann (Barnes, 1992). Ferner ist bekannt, dass der Austausch einzelner Aminosäuren einen erheblichen Einfluss auf die Spezifität und Affinität von Proteinen haben kann, welches sich z. B. in der Wirtsspezifität von Viren (Glaser *et al.*, 2005; Rogers *et al.*, 1983) und der Antigenspezifität und Affinität von Antikörpern (Kussie *et al.*, 1994; Lippow *et al.*, 2007) äußert. Auch für Calmodulin konnten, gestützt durch computerbasiertes Design Mutanten erzeugt werden, die eine bis zu 900-fach höhere Spezifität für ein von der CaM-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) abgeleitetes Peptid aufweisen (Yosef *et al.*, 2009). Folglich sollte eine Generierung optimierter Calmodulin-Linker mithilfe dieser Methoden möglich sein.

Eine andere Möglichkeit basiert auf Selektion und Screening weiterer Calmodulin-Bindepeptide mit geeigneten Selektionssystemen, wie z. B. Phagen-Display (vgl. 2.4.1) oder Peptid-Arrays (Loeffler *et al.*, 2016). Mittels Phagen-Display konnten aus einer Zufallsbibliothek Peptide isoliert werden, die eine calciumabhängige Bindung an Calmodulin zeigten und ferner dessen biologische Funktionen modulierten (Dedman *et al.*, 1993). In einem anderen Ansatz konnten durch Screening einer Bibliothek von Zufallspeptiden spezifische Aminosäuresequenzmotive, die verschiedene CaM-Isoformen aus der Sojabohne *Glycine max* zur optimalen Erkennung eines Zielproteins benötigen, ermittelt werden (Choi *et al.*, 2002).

Somit sollte es möglich sein, durch Selektion und Screening einer Peptidbibliothek Varianten zu identifizieren, die als Teil des Peptid/CaM-Linker-basierten Systems zum gewünschten Effekt

6 DISKUSSION

führen. Ein großer Vorteil des Phagen-Display beruht auf der Einstellung der Selektionsbedingungen, sodass diese je nach gewünschten Eigenschaften des Zielpeptids gewählt werden können. Dadurch sollte u.a. die Isolierung von Peptiden, die unter calciumfreien Bedingungen an Calmodulin binden, möglich sein (Chagot & Chazin, 2011).

Ferner ist bekannt, dass außer Calcium auch andere Ionen in der Lage sind, Calmodulin zu binden und eine Konformationsänderung zu bewirken, womit die Bindung von Interaktionspartnern und deren Aktivierung induziert wird. Ob eine Substituierung möglich ist hängt u.a. vom Radius der Ionen ab. Es konnte gezeigt werden, dass Kationen mit einem ähnlichen Ionenradius wie Ca^{2+} (0,99 Å), wie Sm^{3+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Sr^{2+} und Zn^{2+} , bei Bindung von Calmodulin eine Konformationsänderung hervorrufen und dadurch in der Lage sind, natürliche Interaktionspartner von Calmodulin zu stimulieren. Hierbei hängt die Effektivität der Substituierung direkt mit dem Ionenradius zusammen und nimmt mit zunehmender Ähnlichkeit zu Ca^{2+} zu (Chao *et al.*, 1984; Habermann *et al.*, 1983).

Ein Großteil dieser Ionen spielt in natürlichen zellulären Prozessen normalerweise keine Rolle, sondern es handelt sich vielmehr um Umweltgifte, die sich in Geweben anreichern und schwere Schäden verursachen können (Vallee & Ulmer, 1972). In der Tat wird vermutet, dass die hohe Affinität zu Calmodulin zur Toxizität der Ionen beiträgt (Cox & Harrison, 1983). Auf dieser Basis wäre ein Einsatz in zellulären und therapeutischen Anwendungen nicht möglich. In anderen Applikationen, wie der Reinigung von Proteinen mithilfe schaltbarer scFvs, sollte dies allerdings keinen Nachteil darstellen, da auch schon in anderen Ansätzen, wie z. B. der immobilisierten Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC), der Einsatz von Schwermetallen wie Ni^{2+} , Zn^{2+} und Cu^{2+} essentiell ist (Porath *et al.*, 1975).

Ca^{2+} -Calmodulin interagiert über hydrophobe Wechselwirkungen nicht nur mit Proteinpartnern, sondern auch mit einer Reihe meist aromatischer, positiv geladener Moleküle (Sakai & Krishna, 1999). Die Gruppe der Phenothiazine, die als antipsychotische Substanzen eingesetzt werden (Hogarty *et al.*, 1979), konnten als erste mit Calmodulin interagierende Medikamente identifiziert werden. Bei Bindung von Trifluoperazin an Ca^{2+} -Calmodulin kommt es wie bei Bindung von Proteinpartnern zu einer Änderung der Konformation von Calmodulin (Vandonselaar *et al.*, 1994). Hierin liegt sehr wahrscheinlich der Wirkmechanismus sogenannter Calmodulin-Antagonisten begründet, da dadurch die Interaktion mit den eigentlichen Zielproteinen inhibiert wird (Zimmer & Hofmann, 1987).

Ferner ist bekannt, dass in einigen Tumorarten erhöhte Level an Ca^{2+} -Calmodulin vorherrschen (Wei *et al.*, 1982). Da Calmodulin als Regulator der Zellproliferation wirkt und dadurch eine direkte Auswirkung auf das Tumorwachstum hat, besteht hier ein Angriffspunkt für mögliche Krebstherapien mittels Calmodulin-Antagonisten (Hait & Lazo, 1986; Sakai & Krishna, 1999).

Im Hinblick auf das in dieser Arbeit etablierte CaM-basierte scFv-System bestände somit die Möglichkeit, affinitätsmodulierende CaM-Bindepeptide durch CaM-Antagonisten zu ersetzen. Durch solche CaM-Antagonisten könnte z. B. ein Sicherheitsmechanismus zur Verhinderung

überschießender Immunreaktionen bei der CAR-T-Zell-Therapie verwirklicht werden. Für einen sicheren Einsatz von CAR-T-Zellen ist es essentiell, die zytotoxische Wirkung der Zellen bei Bedarf wieder abstellen zu können (Gill & June, 2015). Um Wechselwirkungen mit *in vivo* vorkommendem Calmodulin zu verhindern, müssten dabei Moleküle gewählt werden, die beispielsweise nur an entsprechend passend mutierte Varianten des CaM-Linkers binden. Die Identifikation geeigneter Moleküle könnte z. B. über Microarray-basierte Methoden erfolgen (Barnes-Seeman *et al.*, 2003).

6.4 Fazit und Ausblick

Es wurde erfolgreich gezeigt, dass die Insertion permutierter Calmodulin-Varianten als Linkerregion verschiedener scFv-Fragmente zu einer Calmodulin-Bindepeptid-abhängigen Regulation der Antikörper-Antigen-Bindungsaffinität führt. Dadurch konnte die Hypothese, dass in der Linkerregion induzierte Konformationsänderungen einen Einfluss auf die Antigenbindung haben, bestätigt werden. Dies wird sehr wahrscheinlich durch Änderungen in der Paratopstruktur verursacht, wie z. B. einer Änderung der Position von V_H zu V_L . Exemplarisch konnte gezeigt werden, dass die M13-Peptid-abhängige Verringerung des Bindungssignals eher auf einer Änderung der Paratopstruktur beruht und dass Dimerisierung und Aggregation hierbei keine Rolle spielen. Diese Hypothese muss mit weiteren Beispielen untermauert werden. Weitere Charakterisierungen mittels Röntgenkristallographie würden hier bessere Hinweise über die genaue Struktur der scFv-CaM-Fusionen unter Einfluss der verschiedenen Calmodulin-Bindepeptide geben.

Das „*Proof of Concept*“ erfolgte mit dem α -Lysozym-Antikörper D1.3, welcher eine große und eher flache Interaktionsoberfläche zum Antigen besitzt. Durch Permutagenese konnten Calmodulin-Varianten erzeugt werden, die eine im Vergleich zur Wildtyp-CaM-Variante verbesserte Modulation der Bindungsaffinität bewirken. Eine Übertragung des linkerbasierten Moduls auf 4 weitere Spezifitäten, darunter einen haptenbindenden scFv, bei dem eine kleine Paratopstruktur vermutet werden kann, war erfolgreich. Durch Einsatz weiterer Calmodulin-Bindepeptide, alternativ zum M13-Peptid, konnten die erzielten Bindungsänderungen noch verstärkt oder sogar umgekehrt werden. Ferner wurde exemplarisch gezeigt, dass durch Integration eines CaM-Linkers die initiale Affinität des scFvs nur gering beeinflusst wird.

Abschließend kann festgehalten werden, dass im Rahmen dieser Arbeit linkerbasierte Module zur Generierung schaltbarer scFv-Antikörperfragmente identifiziert wurden. Durch Kombination der besten CaM-Varianten mit den vielversprechendsten Calmodulin-Bindepeptiden sollte eine Identifizierung funktioneller Module für diverse weitere scFv-Spezifitäten möglich sein. Die Vielfalt der möglichen Kombinationen von Calmodulin-Linkervarianten, Schaltpeptiden und Ionen bietet breiten Raum für weitere Verbesserungen. Für verschiedene konkrete

6 DISKUSSION

Fragestellungen stehen damit umfangreiche Möglichkeiten für eine anwendungsspezifische Optimierung zur Verfügung (vgl. 6.3).

Das in dieser Arbeit etablierte linkerbasierte System zur Modulation von Bindungsaffinitäten in scFv-Fragmenten eröffnet deshalb neue Wege für Anwendungen in der Proteinreinigung, Zellseparation und sogar bei antikörperbasierten Therapien.

7 Literaturverzeichnis

- ABHINANDAN, K.R., & MARTIN, A.C.R. (2010). Analysis and prediction of VH/VL packing in antibodies. *Protein Eng Des Sel* **23**, (9), 689–697.
- AMIT, A.G., MARIUZZA, R.A., PHILLIPS, S.E., & POLJAK, R.J. (1984). Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 6 Å resolution. *Nature* **313**, (5998), 156–158.
- AMIT, A.G., MARIUZZA, R.A., PHILLIPS, S.E., & POLJAK, R.J. (1986). Three-Dimensional Structure of an Antigen-Antibody Complex at 2.8 Å Resolution. *Science* **233**, (4765), 747–753.
- ANTAL-SZALMAS, P., STRIJP, J.A., WEERSINK, A.J., VERHOEF, J., & VAN KESSEL, K.P. (1997). Quantitation of surface CD14 on human monocytes and neutrophils. *J Leukoc Biol* **61**, (6), 721–728.
- APEL, E.D., BYFORD, M.F., AU, D., WALSH, K.A., & STORM, D.R. (1990). Identification of the Protein Kinase C Phosphorylation Site in Neuromodulin. *Biochemistry* **29**, (9), 2330–2335.
- ARNOLD-SCHILD, D., KLEIST, C., WELSCHOF, M., OPELZ, G., RAMMENSEE, H.-G., SCHILD, H., & TERNESS, P. (2000). One-Step Single-Chain Fv Recombinant Antibody-based Purification of gp96 for Vaccine Development. *Cancer Res* **60**, (15), 4175–4178.
- BAEUEERLE, P.A., & REINHARDT, C. (2009). Bispecific T-Cell Engaging Antibodies for Cancer Therapy. *Cancer Res* **69**, (12), 4941–4944.
- BAIRD, G.S., ZACHARIAS, D.A., & TSIEN, R.Y. (1999). Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci* **96**, (20), 11241–11246.
- BARNES, W.M. (1992). The fidelity of Taq polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion. *Gene* **112**, (1), 29–35.
- BARNES-SEEMAN, D., PARK, S.B., KOEHLER, A.N., & SCHREIBER, S.L. (2003). Expanding the Functional Group Compatibility of Small-Molecule Microarrays: Discovery of Novel Calmodulin Ligands. *Angew Chemie Int Ed* **42**, (21), 2376–2379.
- BAUDIER, J., DELOULME, J.C., DORSSELAER, A. VAN, BLACK, D., & MATTHES, H.W. (1991). Purification and Characterization of a Brain-specific Protein Kinase C Substrate, Neurogranin (p17). *J Biol Chem* **266**, (1), 229–237.
- BIRD, R.E., HARDMAN, K.D., JACOBSON, J.W., JOHNSON, S., KAUFMAN, B.M., LEE, S.M., LEE, T., POPE, S.H., RIORDAN, G.S., & WHITLOW, M. (1988). Single-Chain Antigen-Binding Proteins. *Science* **242**, (4877), 423–426.
- BLUMENTHAL, D.K., TAKIO, K., EDELMAN, A.M., CHARBONNEAU, H., TITANI, K., WALSH, K.A., & KREBS, E.G. (1985). Identification of the calmodulin-binding domain of skeletal muscle myosin light chain kinase. *Proc Natl Acad Sci* **82**, (10), 3187–3191.
- BODER, E.T., & WITTRUP, K.D. (1997). Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol* **15**, (6), 553–557.
- BODER, E.T., MIDELFORT, K.S., & WITTRUP, K.D. (2000). Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, (20), 10701–10705.
- BONVIN, P., VENET, S., FONTAINE, G., RAVN, U., GUENEAU, F., KOSCO-VILBOIS, M., PROUDFOOT, A.E., & FISCHER, N. (2015). De novo isolation of antibodies with pH-dependent binding properties. *MAbs* **7**, (2), 294–302.
- BRADFORD, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* **72**, (1–2), 248–254.
- BREITLING, F., DÜBEL, S., SEEHAUS, T., KLEWINGHAUS, I., & LITTLE, M. (1991). A surface expression vector for antibody screening. *Gene* **104**, (2), 147–153.
- BRENTJENS, R.J., DAVILA, M.L., RIVIERE, I., PARK, J., WANG, X., COWELL, L.G., BARTIDO,

- S., STEFANSKI, J., TAYLOR, C., OLSZEWSKA, M., BORQUEZ-OJEDA, O., QU, J., WASIELEWSKA, T., HE, Q., BERNAL, Y., RIJO, I. V., HEDVAT, C., KOBOS, R., CURRAN, K., STEINHERZ, P., JURCIC, J., ROSENBLAT, T., MASLAK, P., FRATTINI, M., ET AL. (2013). CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* **5**, (177), 177ra38.
- BUCHWALDER, A., SZADKOWSKI, H., & KIRSCHNER, K. (1992). A Fully Active Variant of Dihydrofolate Reductase with a Circularly Permuted Sequence. *Biochemistry* **31**, (6), 1621–1630.
- BUSCHMEIER, B., MEYER, H.E., & MAYR, G.W. (1987). Characterization of the Calmodulin-binding Sites of Muscle Phosphofructokinase and Comparison with Known Calmodulin-binding Domains. *J Biol Chem* **262**, (20), 9454–9462.
- CAI, Z., GREENE, M.I., & BEREZOV, A. (2008). Modulation of biomolecular interactions with complex-binding small molecules. *Methods* **46**, (1), 39–46.
- CAO, P., ZHANG, W., GUI, W., DONG, Y., JIANG, T., & GONG, Y. (2014). Structural insights into the mechanism of calmodulin binding to death receptors. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* **70**, (6), 1604–1613.
- CARRINGTON, D.M., AUFFRET, A., & HANKE, D.E. (1985). Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A. *Nature* **313**, (5997), 64–67.
- CARTER, P., KELLEY, R.F., RODRIGUES, M.L., SNEDECOR, B., COVARRUBIAS, M., VELLIGAN, M.D., WONG, W.L.T., ROWLAND, A.M., KOTTS, C.E., CARVER, M.E., YANG, M., BOURELL, J.H., SHEPARD, H.M., & HENNER, D. (1992). High Level Escherichia coli Expression and Production of a Bivalent Humanized Antibody Fragment. *Bio/Technology* **10**, (2), 163–167.
- CHAGOT, B., & CHAZIN, W.J. (2011). Solution NMR Structure of Apo-Calmodulin in Complex with the IQ Motif of Human Cardiac Sodium Channel NaV1.5. *J Mol Biol* **406**, (1), 106–119.
- CHAO, G., LAU, W.L., HACKEL, B.J., SAZINSKY, S.L., LIPPOW, S.M., & WITTRUP, K.D. (2006). Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. *Nat Protoc* **1**, (2), 755–768.
- CHAO, S.H., SUZUKI, Y., ZYSK, J.R., & CHEUNG, W.Y. (1984). Activation of Calmodulin by Various Metal Cations as a Function of Ionic Radius. *Mol Pharmacol* **26**, (1), 75–82.
- CHAPMAN, A.P., ANTONIW, P., SPITALI, M., WEST, S., STEPHENS, S., & KING, D.J. (1999). Therapeutic antibody fragments with prolonged in vivo half-lives. *Nat Biotechnol* **17**, (8), 780–783.
- CHAPMAN-SMITH, A., & CRONAN, J.E. (1999). Molecular Biology of Biotin Attachment to Proteins. *J Nutr* **129**, (2S Suppl), 477S–484S.
- CHARBONNEAU, H., & CORMIER, M.J. (1979). Purification of Plant Calmodulin by Fluphenazine-Sepharose Affinity Chromatography. *Biochem Biophys Res Commun* **90**, (3), 1039–1047.
- CHATTOPADHYAYA, R., MEADOR, W.E., MEANS, A.R., & QUIOCHO, F.A. (1992). Calmodulin Structure Refined at 1.7 Å Resolution. *J Mol Biol* **228**, (4), 1177–1192.
- CHAUDHARY, V.K., QUEEN, C., JUNGHANS, R.P., WALDMANN, T.A., FITZGERALD, D.J., & PASTAN, I. (1989). A recombinant immunotoxin consisting of two antibody variable domains fused to Pseudomonas exotoxin. *Nature* **339**, (6223), 394–397.
- CHELTSOV, A. V., BARBER, M.J., & FERREIRA, G.C. (2001). Circular Permutation of 5-Aminolevulinate Synthase. Mapping the Polypeptide Chain to its Function. *J Biol Chem* **276**, (22), 19141–19149.
- CHEUNG, W.Y. (1980). Calmodulin Plays a Pivotal Role in Cellular Regulation. *Science* **207**, (4426), 19–27.
- CHILKOTI, A., & MEYER, D.E. (1999). Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides. *Nat Biotechnol* **17**, (11), 1112–1115.
- CHIN, D., & MEANS, A.R. (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol* **10**, (8), 322–328.
- CHOI, J.Y., LEE, S.H., PARK, C.Y., HEO, W. DO, KIM, J.C., KIM, M.C., CHUNG, W.S., MOON, B.C., CHEONG, Y.H., KIM, C.Y., YOO, J.H., KOO, J.C., OK, H.M., CHI, S.-W., RYU, S.-E.,

- LEE, S.Y., LIM, C.O., & CHO, M.J. (2002). Identification of Calmodulin Isoform-specific Binding Peptides from a Phage-displayed Random 22-mer Peptide Library. *J Biol Chem* **277**, (24), 21630–21638.
- CLAPPERTON, J.A., MARTIN, S.R., SMERDON, S.J., GAMBLIN, S.J., & BAYLEY, P.M. (2002). Structure of the Complex of Calmodulin with the Target Sequence of Calmodulin-Dependent Protein Kinase I: Studies of the Kinase Activation Mechanism ‡. *Biochemistry* **41**, (50), 14669–14679.
- CLEGG, R.M. (1995). Fluorescence resonance energy transfer. *Curr Opin Biotechnol* **6**, (1), 103–110.
- COHEN, P., BURCHELL, A., FOULKES, J.G., COHEN, P.T.W., VANAMAN, T.C., & NAIRN, A.C. (1978). Identification of the Ca²⁺-dependent modulator protein as the fourth subunit of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase. *FEBS Lett* **92**, (2), 287–293.
- COMTE, M., MAULET, Y., & COX, J.A. (1983). Ca²⁺-dependent high-affinity complex formation between calmodulin and melittin. *Biochem J* **209**, (1), 269–272.
- COX, J.L., & HARRISON, S.D. (1983). Correlation of metal toxicity with in vitro calmodulin inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* **115**, (1), 106–111.
- CRIVICI, A., & IKURA, M. (1995). Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **24**, 85–116.
- CUNNINGHAM, B.C., & WELLS, J.A. (1989). High-Resolution Epitope Mapping of hGH-Receptor Interactions by Alanine-Scanning Mutagenesis. *Science* **244**, (4908), 1081–1085.
- CUNNINGHAM, B.A., HEMPERLY, J.J., HOPP, T.P., & EDELMAN, G.M. (1979). Favin versus concanavalin A: Circularly permuted amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, (7), 3218–3222.
- DEDMAN, J.R., KAETZEL, M.A., CHAN, H.C., NELSON, D.J., & JAMIESON, G A, J. (1993). Selection of Targeted Biological Modifiers from a Bacteriophage Library of Random Peptides. The Identification of Novel Calmodulin Regulatory Peptides. *J Biol Chem* **268**, (31), 23025–23030.
- DOSE, C., & BRIEDEN, J. (2014). Release system for cell-antibody-substrate conjugates containing a polyethylene glycol spacer unit. European Patent 12189516.3.
- DÜBEL, S. (2005). Fv constructs with an influenceable affinity for a substance that is to be linked. US Patent 10/344,447.
- DÜBEL, S. (2007). Therapeutic Antibodies - from Past to Future. In Handbook of Therapeutic Antibodies, S. Dübel, ed. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), pp. 3–16.
- DÜBEL, S., BREITLING, F., KLEWINGHAUS, I., & LITTLE, M. (1992). Regulated Secretion and Purification of Recombinant Antibodies in E. coli. *Cell Biophys* **21**, (1–3), 69–79.
- DÜBEL, S., STOEVE SANDT, O., TAUSSIG, M.J., & HUST, M. (2010). Generating recombinant antibodies to the complete human proteome. *Trends Biotechnol* **28**, (7), 333–339.
- EHLERS, M.D., ZHANG, S., BERNHARDT, J.P., & HUGANIR, R.L. (1996). Inactivation of NMDA Receptors by Direct Interaction of Calmodulin with the NR1 Subunit. *Cell* **84**, (5), 745–755.
- EINHAUER, A., & JUNGBAUER, A. (2001). The FLAGTM peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J Biochem Biophys Methods* **49**, (1), 455–465.
- ELSHORST, B., HENNIG, M., FÖRSTERLING, H., DIENER, A., MAURER, M., SCHULTE, P., SCHWALBE, H., GRIESINGER, C., KREBS, J., SCHMID, H., VORHERR, T., & CARAFOLI, E. (1999). NMR Solution Structure of a Complex of Calmodulin with a Binding Peptide of the Ca²⁺ Pump †, ‡. *Biochemistry* **38**, (38), 12320–12332.
- ENGVAL, E., & PERLMANN, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, (9), 871–874.
- FORSTER, T. (1946). Energiewanderung und Fluoreszenz. *Naturwissenschaften* **33**, (6), 166–175.
- FRANCISCO, J.A., CAMPBELL, R., IVERSON, B.L., & GEORGIU, G. (1993). Production and fluorescence-activated cell sorting of Escherichia coli expressing a functional antibody fragment on the external surface. *Proc Natl Acad Sci* **90**, (22), 10444–10448.
- FRIGUET, B., CHAFFOTTE, A.F., DJAVADI-OHANIAN, L., & GOLDBERG, M.E. (1985). Measurements of the True Affinity Constant in Solution of Antigen-Antibody Complexes by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Immunol Methods* **77**, (2), 305–319.
- GILL, S., & JUNE, C.H. (2015). Going viral: chimeric antigen receptor T-cell therapy for

- hematological malignancies. *Immunol Rev* **263**, (1), 68–89.
- GLASER, L., STEVENS, J., ZAMARIN, D., WILSON, I.A., GARCÍA-SASTRE, A., TUMPEY, T.M., BASLER, C.F., TAUBENBERGER, J.K., & PALESE, P. (2005). A Single Amino Acid Substitution in 1918 Influenza Virus Hemagglutinin Changes Receptor Binding Specificity. *J Virol* **79**, (17), 11533–11536.
- GOLDENBERG, D.P., & CREIGHTON, T.E. (1983). Circular and Circularly Permuted Forms of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor. *J Mol Biol* **165**, (2), 407–413.
- GOYERT, S.M., & FERRERO, E. (1987). Biochemical analysis of myeloid antigens and cDNA expression of gp55 (CD14). In *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*, A.J. McMichael, ed. (New York (USA): Oxford University Press), pp. 613–618.
- GRAF, R., & SCHACHMAN, H.K. (1996). Random circular permutation of genes and expressed polypeptide chains: Application of the method to the catalytic chains of aspartate transcarbamoylase. *Proc Natl Acad Sci* **93**, (21), 11591–11596.
- GRAFF, J.M., RAJAN, R.R., RANDALL, R.R., NAIRN, A.C., & BLACKSHEAR, P.J. (1991). Protein Kinase C Substrate and Inhibitor Characteristics of Peptides Derived from the Myristoylated Alanine-rich C Kinase Substrate (MARCKS) Protein Phosphorylation Site Domain. *J Biol Chem* **266**, (22), 14390–14398.
- GUNTAS, G., MITCHELL, S.F., & OSTERMEIER, M. (2004). A Molecular Switch Created by In Vitro Recombination of Nonhomologous Genes. *Chem Biol* **11**, (11), 1483–1487.
- GUNTAS, G., MANSELL, T.J., KIM, J.R., & OSTERMEIER, M. (2005). Directed evolution of protein switches and their application to the creation of ligand-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci* **102**, (32), 11224–11229.
- HA, J.-H., & LOH, S.N. (2012). Protein Conformational Switches: From Nature to Design. *Chemistry (Easton)* **18**, (26), 7984–7999.
- HABERMANN, E., CROWELL, K., & JANICKI, P. (1983). Lead and Other Metals can Substitute for Ca²⁺ in Calmodulin. *Arch Toxicol* **54**, (1), 61–70.
- HAIECH, J., KLEE, C.B., DEMAILLE, J.G., & HAIECH, J. (1981). Effects of Cations on Affinity of Calmodulin for Calcium: Ordered Binding of Calcium Ions Allows the Specific Activation of Calmodulin-Stimulated Enzymes. Theoretical Approach to Study of Multiple Ligand Binding to a Macromolecule. *Biochemistry* **20**, (13), 3890–3897.
- HAIT, W.N., & LAZO, J.S. (1986). Calmodulin: A Potential Target for Cancer Chemotherapeutic Agents. *J Clin Oncol* **4**, (6), 994–1012.
- HALLING, D.B., GEORGIU, D.K., BLACK, D.J., YANG, G., FALLON, J.L., QUIOCHO, F.A., PEDERSEN, S.E., & HAMILTON, S.L. (2009). Determinants in CaV1 Channels That Regulate the Ca²⁺ Sensitivity of Bound Calmodulin. *J Biol Chem* **284**, (30), 20041–20051.
- HANAHAN, D. (1983). Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J Mol Biol* **166**, (4), 557–580.
- HANES, J., & PLÜCKTHUN, A. (1997). In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, (10), 4937–4942.
- HATHAWAY, D.R., ADELSTEIN, R.S., & KLEE, C.B. (1981). Interaction of Calmodulin with Myosin Light Chain Kinase and cAMP-dependent Protein Kinase in Bovine Brain. *J Biol Chem* **256**, (15), 8183–8189.
- HAWKINS, R.E., RUSSELL, S.J., BAIER, M., & WINTER, G. (1993). The Contribution of Contact and Non-contact Residues of Antibody in the Affinity of Binding to Antigen. The Interaction of Mutant D1.3 Antibodies with Lysozyme. *J Mol Biol* **234**, (4), 958–964.
- HEALEY, D., DIANDA, L., MOORE, J.P., MCDUGAL, J.S., MOORE, M.J., ESTESS, P., BUCK, D., KWONG, P.D., BEVERLEY, P.C., & SATTENTAU, Q.J. (1990). Novel Anti-CD4 Monoclonal Antibodies Separate Human Immunodeficiency Virus Infection and Fusion of CD4+ Cells from Virus Binding. *J Exp Med* **172**, (4), 1233–1242.
- HERZENBERG, L.A., PARKS, D., SAHAF, B., PEREZ, O., ROEDERER, M., & HERZENBERG, L.A. (2002). The History and Future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and Flow Cytometry: A View from Stanford. *Clin Chem* **48**, (10), 1819–1827.
- HIRONIWA, N., ISHII, S., KADONO, S., IWAYANAGI, Y., MIMOTO, F., HABU, K., IGAWA, T., & HATTORI, K. (2016). Calcium-dependent antigen binding as a novel modality for antibody recycling by endosomal antigen dissociation. *MAbs* **8**, (1), 65–73.

- HOGARTY, G.E., SCHOOLER, N.R., ULRICH, R., MUSSARE, F., FERRO, P., HERRON, E., ML, G., JM, D., LEFF JP, W.J., HOGARTY GE, G.S.S.N. ET AL, LINN MW, C.E.K.C. ET AL, HOGARTY GE, U.R.G.S. ET AL, H, F., DENHAM J, A.L., SO, R., BLACKWELL B, S.M., ITIL T, K.A., HIRSCH SR, G.R.R.P. ET AL, C, C., DAW, J., CRAWFORD R, F.A., RIFKIN A, Q.F.R.C. ET AL, HOGARTY GE, U.R., DEL GIUDICE J, C.W.G.E., ET AL. (1979). Fluphenazine and Social Therapy in the Aftercare of Schizophrenic Patients. *Arch Gen Psychiatry* **36**, (12), 1283.
- HOLLIGER, P., PROSPERO, T., & WINTER, G. (1993). Diabodies: Small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, (14), 6444–6448.
- HOOGENBOOM, H.R. (2005). Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* **23**, (9), 1105–1116.
- HUDSON, P.J., & KORTT, A.A. (1999). High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. *J Immunol Methods* **231**, (1), 177–189.
- HULTSCHIG, C., HECHT, H.-J., & FRANK, R. (2004). Systematic Delineation of a Calmodulin Peptide Interaction. *J Mol Biol* **343**, (3), 559–568.
- HUSTON, J.S., LEVINSON, D., MUDGETT-HUNTER, M., TAI, M.S., NOVOTNY, J., MARGOLIES, M.N., RIDGE, R.J., BRUCCOLERI, R.E., HABER, E., & CREA, R. (1988). Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* **85**, (16), 5879–5883.
- HWANG, J., FITZGERALD, D.J., ADHYA, S., & PASTAN, I. (1987). Functional Domains of *Pseudomonas* Exotoxin Identified by Deletion Analysis of the Gene Expressed in *E. Coli*. *Cell* **48**, (1), 129–136.
- IGAWA, T., ISHII, S., TACHIBANA, T., MAEDA, A., HIGUCHI, Y., SHIMAOKA, S., MORIYAMA, C., WATANABE, T., TAKUBO, R., DOI, Y., WAKABAYASHI, T., HAYASAKA, A., KADONO, S., MIYAZAKI, T., HARAYA, K., SEKIMORI, Y., KOJIMA, T., NABUCHI, Y., ASO, Y., KAWABE, Y., & HATTORI, K. (2010). Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization. *Nat Biotechnol* **28**, (11), 1203–1207.
- IKURA, M., CLORE, G., GRONENBORN, A., ZHU, G., KLEE, C., & BAX, A. (1992). Solution Structure of a Calmodulin-Target Peptide Complex by Multidimensional NMR. *Science* **256**, (5057), 632–638.
- ISHII, K., HIROSE, K., & IINO, M. (2006). Ca²⁺ shuttling between endoplasmic reticulum and mitochondria underlying Ca²⁺ oscillations. *EMBO Rep* **7**, (4), 390–396.
- IWAKURA, M., NAKAMURA, T., YAMANE, C., & MAKI, K. (2000). Systematic circular permutation of an entire protein reveals essential folding elements. *Nat Struct Biol* **7**, (7), 580–585.
- JAIN, R.K. (1990). Physiological Barriers to Delivery of Monoclonal Antibodies and Other Macromolecules in Tumors. *Cancer Res* **50**, (Supplement), 814s–819s.
- JAMES, P., MAEDA, M., FISCHER, R., VERMA, A.K., KREBS, J., PENNISTON, J.T., & CARAFOLI, E. (1988). Identification and Primary Structure of a Calmodulin Binding Domain of the Ca²⁺ Pump of Human Erythrocytes. *J Biol Chem* **263**, (6), 2905–2910.
- JANEWAY, C.A., TRAVERS, P., WALPORT, M., & SHLOMCHIK, M. (2002). Immunologie (Spektrum Akademischer Verlag).
- JUNG, T., SCHAUER, U., HEUSSER, C., NEUMANN, C., & RIEGER, C. (1993). Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* **159**, (1), 197–207.
- KARLSSON, R., & FÄLT, A. (1997). Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors. *J Immunol Methods* **200**, (1), 121–133.
- KIM, E.Y., RUMPF, C.H., FUJIWARA, Y., COOLEY, E.S., VAN PETEGEM, F., & MINOR, D.L. (2008). Structures of CaV2 Ca²⁺/CaM-IQ Domain Complexes Reveal Binding Modes that Underlie Calcium-Dependent Inactivation and Facilitation. *Structure* **16**, (10), 1455–1467.
- KINCAID, R.L., NIGHTINGALE, M.S., & MARTIN, B.M. (1988). Characterization of a cDNA clone encoding the calmodulin-binding domain of mouse brain calcineurin. *Proc Natl Acad Sci* **85**, (23), 8983–8987.

- KIPRIYANOV, S.M., MOLDENHAUER, G., & LITTLE, M. (1997). High level production of soluble single chain antibodies in small-scale *Escherichia coli* cultures. *J Immunol Methods* **200**, (1), 69–77.
- KLEE, C.B., CROUCH, T.H., & KRINKS, M.H. (1979). Calcineurin: A calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci* **76**, (12), 6270–6273.
- KOBATAKE, E., KOSAKU, C., HANZAWA, S., & MIE, M. (2012). Construction of affinity changeable antibody in response to Ca^{2+} . *Biotechnol Lett* **34**, (6), 1019–1023.
- KONDO, T., FITZGERALD, D., CHAUDHARY, V.K., ADHYA, S., & PASTAN, I. (1988). Activity of Immunotoxins Constructed with Modified *Pseudomonas* exotoxin A Lacking the Cell Recognition Domain. *J Biol Chem* **263**, (19), 9470–9475.
- KREITMAN, R.J., PURI, R.K., & PASTAN, I. (1994). A circularly permuted recombinant interleukin 4 toxin with increased activity. *Proc Natl Acad Sci* **91**, (15), 6889–6893.
- KREITMAN, R.J., PURI, R.K., & PASTAN, I. (1995). Increased Antitumor Activity of a Circularly Permuted Interleukin 4-Toxin in Mice with Interleukin 4 Receptor-bearing Human Carcinoma. *Cancer Res* **55**, (15), 3357–3363.
- KRETSINGER, R.H., & NOCKOLDS, C.E. (1973). Carp Muscle Calcium-binding Protein. II. Structure Determination and General Description. *J Biol Chem* **248**, (9), 3313–3326.
- KUBONIWA, H., TJANDRA, N., GRZESIEK, S., REN, H., KLEE, C.B., & BAX, A. (1995). Solution structure of calcium-free calmodulin. *Nat Struct Biol* **2**, (9), 768–776.
- KUSSIE, P.H., PARHAMI-SEREN, B., WYSOCKI, L.J., & MARGOLIES, M.N. (1994). A Single Engineered Amino Acid Substitution Changes Antibody Fine Specificity. *J Immunol* **152**, (1), 146–152.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, (5259), 680–685.
- LETO, T., PLEASIC, S., FORGET, B., BENZ, E.J., & MARCHESI, V. (1989). Characterization of the Calmodulin-binding Site of Nonerythroid α -Spectrin. Recombinant protein and model peptide studies. *J Biol Chem* **264**, (10), 5826–5830.
- LEWIT-BENTLEY, A., & RÉTY, S. (2000). EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* **10**, (6), 637–643.
- LI, F., VIJAYASANKARAN, N., SHEN, A. (YIJUAN), KISS, R., & AMANULLAH, A. (2010). Cell culture processes for monoclonal antibody production. *MAbs* **2**, (5), 466–479.
- LIANG, J., KIM, J.R., BOOCK, J.T., MANSELL, T.J., & OSTERMEIER, M. (2007). Ligand binding and allostery can emerge simultaneously. *Protein Sci* **16**, (5), 929–937.
- LIN, Y.M., LIU, Y.P., & CHEUNG, W.Y. (1974). Cyclic 3':5'-Nucleotide Phosphodiesterase. Purification, Characterization, and Active Form of the Protein Activator from Bovine Brain. *J Biol Chem* **249**, (15), 4943–4954.
- LINSE, S., HELMERSSON, A., & FORSEN, S. (1991). Calcium Binding to Calmodulin and Its Globular Domains. *J Biol Chem* **266**, (13), 8050–8054.
- LIPPOW, S.M., WITTRUP, K.D., & TIDOR, B. (2007). Computational design of antibody-affinity improvement beyond in vivo maturation. *Nat Biotechnol* **25**, (10), 1171.
- LIU, Z., & VOGEL, H.J. (2012). Structural basis for the regulation of L-type voltage-gated calcium channels: interactions between the N-terminal cytoplasmic domain and Ca^{2+} -calmodulin. *Front Mol Neurosci* **5**, (38), 1–16.
- LIU, Y., ZHENG, X., MUELLER, G.A., SOBHANY, M., DEROSE, E.F., ZHANG, Y., LONDON, R.E., & BIRNBAUMER, L. (2012). Crystal Structure of Calmodulin Binding Domain of Orail in Complex with Ca^{2+} Calmodulin Displays a Unique Binding Mode. *J Biol Chem* **287**, (51), 43030–43041.
- LOEFFLER, F.F., FOERTSCH, T.C., POPOV, R., MATTES, D.S., SCHLAGETER, M., SEDLMAYR, M., RIDDER, B., DANG, F.-X., VON BOJNICIĆ-KNINSKI, C., WEBER, L.K., FISCHER, A., GREIFENSTEIN, J., BYKOVSKAYA, V., BULIEV, I., BISCHOFF, F.R., HAHN, L., MEIER, M.A.R., BRÄSE, S., POWELL, A.K., BALABAN, T.S., BREITLING, F., NESTEROV-MUELLER, A., CHRISEY, D.B., ARNOLD, C.B., ET AL. (2016). High-flexibility combinatorial peptide synthesis with laser-based transfer of monomers in solid matrix material. *Nat Commun* **7**, 11844.
- MACK, M., RIETHMÜLLER, G., & KUFER, P. (1995). A small bispecific antibody construct

- expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci* **92**, (15), 7021–7025.
- MALENCIK, D.A., & ANDERSON, S.R.** (1983). High affinity binding of the mastoparans by calmodulin. *Biochem Biophys Res Commun* **114**, (1), 50–56.
- MALONE, T., BLUMENTHAL, R.M., & CHENG, X.** (1995). Structure-guided Analysis Reveals Nine Sequence Motifs Conserved among DNA Amino-methyl-transferases, and Suggests a Catalytic Mechanism for these Enzymes. *J Mol Biol* **253**, (4), 618–632.
- MARIUZZA, R.A., JANKOVIC, D.L., BOULOT, G., AMIT, A.G., SALUDJIAN, P., LE GUERN, A., MAZIÉ, J.C., & POLJAK, R.J.** (1983). Preliminary Crystallographic Study of the Complex Between the Fab Fragment of a Monoclonal Anti-lysozyme Antibody and its Antigen. *J Mol Biol* **170**, (4), 1055–1058.
- MATSUBARA, M., TITANI, K., & TANIGUCHI, H.** (1996). Interaction of Calmodulin-Binding Domain Peptides of Nitric Oxide Synthase with Membrane Phospholipids: Regulation by Protein Phosphorylation and Ca^{2+} -Calmodulin †. *Biochemistry* **35**, (46), 14651–14658.
- MCCAFFERTY, J., GRIFFITHS, A.D., WINTER, G., & CHISWELL, D.J.** (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**, (6301), 552–554.
- MCDANIEL, J.R., CALLAHAN, D.J., & CHILKOTI, A.** (2010). Drug delivery to solid tumors by elastin-like polypeptides. *Adv Drug Deliv Rev* **62**, (15), 1456–1467.
- MEADOR, W., MEANS, A., & QUIOCHO, F.** (1993). Modulation of Calmodulin Plasticity in Molecular Recognition on the Basis of X-ray Structures. *Science* **262**, (5140), 1718–1721.
- MEGEED, Z., WINTERS, R.M., & YARMUSH, M.L.** (2006). Modulation of Single-Chain Antibody Affinity with Temperature-Responsive Elastin-Like Polypeptide Linkers. *Biomacromolecules* **7**, (4), 999–1004.
- MEISTER, G.E., & JOSHI, N.S.** (2013). An Engineered Calmodulin-Based Allosteric Switch for Peptide Biosensing. *ChemBioChem* **14**, (12), 1460–1467.
- MEISTER, G.E., KANWAR, M., & OSTERMEIER, M.** (2011). Circular Permutation of Proteins. In *Protein Engineering Handbook*, (Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), pp. 453–471.
- MEYER, D.E., KONG, G.A., DEWHIRST, M.W., ZALUTSKY, M.R., & CHILKOTI, A.** (2001). Targeting a Genetically Engineered Elastin-like Polypeptide to Solid Tumors by Local Hyperthermia. *Cancer Res* **61**, (4), 1548–1554.
- MIDELFORT, K.S., & WITTRUP, K.D.** (2006). Context-dependent mutations predominate in an engineered high-affinity single chain antibody fragment. *Protein Sci* **15**, (2), 324–334.
- MIDELFORT, K.S., HERNANDEZ, H.H., LIPPOW, S.M., TIDOR, B., DRENNAN, C.L., & WITTRUP, K.D.** (2004). Substantial Energetic Improvement with Minimal Structural Perturbation in a High Affinity Mutant Antibody. *J Mol Biol* **343**, (3), 685–701.
- MILTENYI, S.** (1998). Multiparameter cell separation using releasable colloidal magnetic particles. European Patent 96910404.1.
- MILTENYI, S., MÜLLER, W., WEICHEL, W., & RADBRUCH, A.** (1990). High Gradient Magnetic Cell Separation with MACS. *Cytometry* **11**, (2), 231–238.
- MIYAWAKI, A., LLOPIS, J., HEIM, R., MCCAFFERY, J.M., ADAMS, J.A., IKURA, M., & TSIEN, R.Y.** (1997). Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**, (6645), 882–887.
- MONTIGIANI, S., NERI, G., NERI, P., & NERI, D.** (1996). Alanine Substitutions in Calmodulin-binding Peptides Result in Unexpected Affinity Enhancement. *J Mol Biol* **258**, (1), 6–13.
- MORI, M.X., VANDER KOOL, C.W., LEAHY, D.J., & YUE, D.T.** (2008). Crystal Structure of the $\text{CaV}2$ IQ Domain in Complex with Ca^{2+} /Calmodulin: High-Resolution Mechanistic Implications for Channel Regulation by Ca^{2+} . *Structure* **16**, (4), 607–620.
- MOSER, A.C., & HAGE, D.S.** (2010). Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments. *Bioanalysis* **2**, (4), 769–790.
- MUKHERJEE, S., URA, M., HOEY, R.J., & KOSSIAKOFF, A.A.** (2015). A New Versatile Immobilization Tag Based on the Ultra High Affinity and Reversibility of the Calmodulin-Calmodulin Binding Peptide Interaction. *J Mol Biol* **427**, (16), 2707–2725.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., & ERLICH, H.** (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring*

- Harb Symp Quant Biol* **51**, 263–273.
- MURTAUGH, M.L., FANNING, S.W., SHARMA, T.M., TERRY, A.M., & HORN, J.R. (2011). A Combinatorial Histidine Scanning Library Approach to Engineer Highly pH-Dependent Protein Switches. *Protein Sci* **20**, (9), 1619–1631.
- NAGAI, T., SAWANO, A., PARK, E.S., & MIYAWAKI, A. (2001). Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺. *Proc Natl Acad Sci* **98**, (6), 3197–3202.
- NAGAI, T., YAMADA, S., TOMINAGA, T., ICHIKAWA, M., & MIYAWAKI, A. (2004). Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca²⁺ by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci* **101**, (29), 10554–10559.
- NAKAI, J., OHKURA, M., & IMOTO, K. (2001). A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **19**, (2), 137–141.
- NERI, D., LALLA, C. DE, PETRUL, H., NERI, P., & WINTER, G. (1995). Calmodulin as a Versatile Tag for Antibody Fragments. *Bio/Technology* **13**, (4), 373–377.
- NEUMANN, J. (2008). Immunbiologie - Eine Einführung (Springer-Verlag).
- NI, W.C., & KLEE, C.B. (1985). Selective Affinity Chromatography with Calmodulin Fragments Coupled to Sepharose. *J Biol Chem* **260**, (11), 6974–6981.
- NIXON, A.E., SEXTON, D.J., & LADNER, R.C. (2014). Drugs derived from phage display. *MAbs* **6**, (1), 73–85.
- NOVACK, J.P., CHARBONNEAU, H., BENTLEY, J.K., WALSH, K.A., & BEAVO, J.A. (1991). Sequence Comparison of the 63-, 61-, and 59-kDa Calmodulin-Dependent Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases. *Biochemistry* **30**, (32), 7940–7947.
- O'NEIL, K.T., & DEGRADO, W.F. (1990). How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic α -helices. *Trends Biochem Sci* **15**, (2), 59–64.
- OHKURA, M.†, MATSUZAKI, M. §, KASAI, H. §, IMOTO, K.†, & NAKAI, J.† (2005). Genetically Encoded Bright Ca²⁺ Probe Applicable for Dynamic Ca²⁺ Imaging of Dendritic Spines. *Anal Chem* **77**, (18), 5861–5869.
- OLSEN, E., DUVIC, M., FRANKEL, A., KIM, Y., MARTIN, A., VONDERHEID, E., JEGASOTHY, B., WOOD, G., GORDON, M., HEALD, P., OSEROFF, A., PINTER-BROWN, L., BOWEN, G., KUZEL, T., FIVENSON, D., FOSS, F., GLODE, M., MOLINA, A., KNOBLER, E., STEWART, S., COOPER, K., STEVENS, S., CRAIG, F., REUBEN, J., ET AL. (2001). Pivotal Phase III Trial of Two Dose Levels of Denileukin Diftitox for the Treatment of Cutaneous T-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* **19**, (2), 376–388.
- ONO, T., SLAUGHTER, G.R., COOK, R.G., & MEANS, A.R. (1989). Molecular Cloning Sequence and Distribution of Rat Calspermin, a High Affinity Calmodulin-binding Protein. *J Biol Chem* **264**, (4), 2081–2087.
- PALMER, A.E., & TSIEN, R.Y. (2006). Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators. *Nat Protoc* **1**, (3), 1057–1065.
- PALMER, A.E., JIN, C., REED, J.C., & TSIEN, R.Y. (2004). Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca²⁺ analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *Proc Natl Acad Sci* **101**, (50), 17404–17409.
- PARMLEY, S.F., & SMITH, G.P. (1988). Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* **73**, (2), 305–318.
- PASTAN, I., HASSAN, R., FITZGERALD, D.J., & KREITMAN, R.J. (2006). Immunotoxin therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, (7), 559–565.
- POLYAK, M.J., & DEANS, J.P. (2002). CD20 Workshop Panel report. In Leucocyte Typing VII, D. Mason, P. Andre, A. Bensussan, C. Buckley, C. Civin, E. Clark, M. De Haas, S. Goyert, M. Hadam, D. Hart, V. Horejsi, Y. Jones, S. Meuer, J. Morrissey, R. Schwartz-Albiez, S. Shaw, D. Simmons, L. Turni, M. Uguccioni, E. Van der Schoot, E. Vivier, and H. Zola, eds. (New York (USA): Oxford University Press), pp. 93–101.
- PONTING, C.P., & RUSSELL, R.B. (1995). Swaposins: circular permutations within genes encoding saposin homologues. (Elsevier Current Trends).
- PORATH, J., CARLSSON, J., OLSSON, I., & BELFRAGE, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, (5536), 598.
- PORTER, D.L., LEVINE, B.L., KALOS, M., BAGG, A., & JUNE, C.H. (2011). Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *N Engl J Med* **365**, (8), 725–

733.

- PRZEPIORKA, D., KO, C.-W., DEISSEROTH, A., YANCEY, C.L., CANDAU-CHACON, R., CHIU, H.-J., GEHRKE, B.J., GOMEZ-BROUGHTON, C., KANE, R.C., KIRSHNER, S., MEHROTRA, N., RICKS, T.K., SCHMIEL, D., SONG, P., ZHAO, P., ZHOU, Q., FARRELL, A.T., & PAZDUR, R. (2015). FDA Approval: Blinatumomab. *Clin Cancer Res* **21**, (18), 4035–4039.
- QIAN, Z., & LUTZ, S. (2005). Improving the Catalytic Activity of *Candida antarctica* Lipase B by Circular Permutation. *J Am Chem Soc* **127**, (39), 13466–13467.
- RICE, J.J., SCHOHN, A., BESSETTE, P.H., BOULWARE, K.T., & DAUGHERTY, P.S. (2006). Bacterial display using circularly permuted outer membrane protein OmpX yields high affinity peptide ligands. *Protein Sci* **15**, (4), 825–836.
- ROGERS, G.N., PAULSON, J.C., DANIELS, R.S., SKEHEL, J.J., WILSON, I.A., & WILEY, D.C. (1983). Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature* **304**, (5921), 76–78.
- ROMOSER, V.A., HINKLE, P.M., & PERSECHINI, A. (1997). Detection in Living Cells of Ca²⁺-dependent Changes in the Fluorescence Emission of an Indicator Composed of Two Green Fluorescent Protein Variants Linked by a Calmodulin-binding Sequence. *J Biol Chem* **272**, (20), 13270–13274.
- ROSKOS, L., KLAKAMP, S., LIANG, M., ARENDS, R., & GREEN, L. (2007). Molecular Engineering II: Antibody Affinity. In *Handbook of Therapeutic Antibodies*, S. Dübel, ed. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), pp. 145–169.
- SAKAI, T.T., & KRISHNA, N.R. (1999). Synthesis and Properties of Some Novel Anti-calmodulin Drugs. *Bioorg Med Chem* **7**, (8), 1559–1565.
- SCHMIEDL, A., ZIMMERMANN, J., SCHERBERICH, J.E., FISCHER, P., & DÜBEL, S. (2006). Recombinant variants of antibody 138H11 against human gamma-glutamyltransferase for targeting renal cell carcinoma. *Hum Antibodies* **15**, (3), 81–94.
- SCHOLLE, M.D., COLLART, F.R., & KAY, B.K. (2004). In vivo biotinylated proteins as targets for phage-display selection experiments. *Protein Expr Purif* **37**, (1), 243–252.
- SCHRÖTER, C., GÜNTHER, R., RHIEL, L., BECKER, S., TOLEIKIS, L., DOERNER, A., BECKER, J., SCHÖNEMANN, A., NASU, D., NEUTEBOOM, B., KOLMAR, H., & HOCK, B. (2015). A generic approach to engineer antibody pH-switches using combinatorial histidine scanning libraries and yeast display. *MAbs* **7**, (1), 138–151.
- SHEARER, W.T., PHILPOTT, G.W., & PARKER, C.W. (1973). Stimulation of Cells by Antibody. *Science* **182**, (4119), 1357–1359.
- SKERRA, A., & PLÜCKTHUN, A. (1988). Assembly of a Functional Immunoglobulin Fv Fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**, (4855), 1038–1041.
- SMITH, G.P. (1985). Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science* **228**, (4705), 1315–1317.
- SMITH, B.J., POPPLEWELL, A., ATHWAL, D., CHAPMAN, A.P., HEYWOOD, S., WEST, S.M., CARRINGTON, B., NESBITT, A., LAWSON, A.D.G., ANTONIW, P., EDELSTON, A., & SUITTERS, A. (2001). Prolonged in Vivo Residence Times of Antibody Fragments Associated with Albumin. *Bioconjug Chem* **12**, (5), 750–756.
- STAERZ, U.D., KANAGAWA, O., & BEVAN, M.J. (1985). Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells. *Nature* **314**, (6012), 628–631.
- STERNBERGER, L.A., HARDY, P.H., CUCULIS, J.J., & MEYER, H.G. (1970). The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* **18**, (5), 315–333.
- STRATTON, M.M., & LOH, S.N. (2011). Converting a protein into a switch for biosensing and functional regulation. *Protein Sci* **20**, (1), 19–29.
- THIE, H., RECK, K., & NOELLE, V. (2014). Anti-CD8 antibody which binding is Ca²⁺ dependent. European Patent 13161984.3.
- TOPP, M.S., KUFER, P., GÖKBUGET, N., GOEBELER, M., KLINGER, M., NEUMANN, S., HORST, H.-A., RAFF, T., VIARDOT, A., SCHMID, M., STELLJES, M., SCHAICH, M., DEGENHARD, E., KÖHNE-VOLLAND, R., BRÜGGEMANN, M., OTTMANN, O., PFEIFER, H., BURMEISTER, T., NAGORSEN, D., SCHMIDT, M., LUTTERBUESE, R., REINHARDT, C., BAEUERLE, P.A.,

- KNEBA, M., ET AL.** (2011). Targeted Therapy With the T-Cell-Engaging Antibody Blinatumomab of Chemotherapy-Refractory Minimal Residual Disease in B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Results in High Response Rate and Prolonged Leukemia-Free Survival. *J Clin Oncol* **29**, (18), 2493–2498.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T., & GORDON, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* **76**, (9), 4350–4354.
- TSUKITA, S., TSUKITA, S., ISHIKAWA, H., KUROKAWA, M., MORIMOTO, K., SOBUE, K., & KAKIUCHI, S.** (1983). Binding Sites of Calmodulin and Actin on the Brain Spectrin, Calspectin. *J Cell Biol* **97**, (2), 574–578.
- URRY, D.W.** (1997). Physical Chemistry of Biological Free Energy Transduction As Demonstrated by Elastic Protein-Based Polymers†. *J Phys Chem B* **101**, 11007–11028.
- VALLEE, B.L., & ULMER, D.D.** (1972). Biochemical Effects of Mercury, Cadmium, and Lead. *Annu Rev Biochem* **41**, (1), 91–128.
- VALLÉE-BÉLISLE, A., & PLAXCO, K.W.** (2010). Structure-switching biosensors: inspired by Nature. *Curr Opin Struct Biol* **20**, (4), 518–526.
- VANANTWERP, J.J., & WITTRUP, K.D.** (1998). Thermodynamic characterization of affinity maturation: the D1.3 antibody and a higher-affinity mutant. *J Mol Recognit* **11**, (1–6), 10–13.
- VANANTWERP, J.J., & WITTRUP, K.D.** (2000). Fine Affinity Discrimination by Yeast Surface Display and Flow Cytometry. *Biotechnol Prog* **16**, (1), 31–37.
- VANDONSELAAR, M., HICKIE, R.A., QUAIL, J.W., & DELBAERE, L.T.** (1994). Trifluoperazine-induced conformational change in Ca²⁺-calmodulin. *Nat Struct Biol* **1**, (11), 795–801.
- WATTERSON, D.M., & VANAMAN, T.C.** (1976). Affinity chromatography purification of a cyclic nucleotide phosphodiesterase using immobilized modulator protein, a troponin C-like protein from brain. *Biochem Biophys Res Commun* **73**, (1), 40–46.
- WEBER, P., OHLENDORF, D., WENDOLOSKI, J., & SALEMME, F.** (1989). Structural Origins of High-Affinity Biotin Binding to Streptavidin. *Science* **243**, (4887), 85–88.
- WEI, J.-W., MORRIS, H.P., & HICKIE, R.A.** (1982). Positive Correlation between Calmodulin Content and Hepatoma Growth Rates. *Cancer Res* **42**, (7), 2571–2574.
- WEIR, A.N.C., NESBITT, A., CHAPMAN, A.P., ANTONIW, A.G.P.P., & LAWSON, A.D.G.** (2002). Formatting antibody fragments to mediate specific therapeutic functions. *Biochem Soc Trans* **30**, (4), 512–516.
- VAN WEZENBEEK, P., & SCHOENMAKERS, J.G.G.** (1979). Nucleotide sequence of the genes III, VI and I of bacteriophage M13. *Nucleic Acids Res* **6**, (8), 2799–2818.
- WHITLOW, M., BELL, B.A., FENG, S.L., FILPULA, D., HARDMAN, K.D., HUBERT, S.L., ROLLENCE, M.L., WOOD, J.F., SCHOTT, M.E., MILENIC, D.E., YOKOTA, T., & SCHLOM, J.** (1993). An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. *Protein Eng* **6**, (8), 989–995.
- YOKOTA, T., MILENIC, D.E., WHITLOW, M., & SCHLOM, J.** (1992). Rapid Tumor Penetration of a Single-Chain Fv and Comparison with Other Immunoglobulin Forms. *Cancer Res* **52**, (12), 3402–3408.
- YOSEF, E., POLITI, R., CHOI, M.H., & SHIFMAN, J.M.** (2009). Computational Design of Calmodulin Mutants with up to 900-Fold Increase in Binding Specificity. *J Mol Biol* **385**, (5), 1470–1480.
- YUAN, T., WELJIE, A.M., & VOGEL, H.J.** (1998). Tryptophan Fluorescence Quenching by Methionine and Selenomethionine Residues of Calmodulin: Orientation of Peptide and Protein Binding †. *Biochemistry* **37**, (9), 3187–3195.
- YUECHUENG, L., & STORM, D.R.** (1990). Regulation of free calmodulin levels by neuromodulin: neuron growth and regeneration. *Trends Pharmacol Sci* **11**, (3), 107–111.
- ZHANG, M., & VOGEL, H.J.** (1994). The Calmodulin-Binding Domain of Caldesmon Binds to Calmodulin in an alpha-Helical Conformation. *Biochemistry* **33**, (5), 1163–1171.
- ZHANG, M., YUAN, T., ARAMINI, J.M., & VOGEL, H.J.** (1995). Interaction of Calmodulin with Its Binding Domain of Rat Cerebellar Nitric Oxide Synthase: A Multinuclear NMR Study. *J Biol Chem* **270**, (36), 20901–20907.
- ZHANG, Y., LI, Z., SACKS, D.B., & AMES, J.B.** (2012). Structural Basis for Ca²⁺-induced

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Activation and Dimerization of Estrogen Receptor alpha by Calmodulin. *J Biol Chem* **287**, (12), 9336–9344.
- ZHOU, T., HAMER, D.H., HENDRICKSON, W.A., SATTENTAU, Q.J., & KWONG, P.D.** (2005). Interfacial metal and antibody recognition. *Proc Natl Acad Sci* **102**, (41), 14575–14580.
- ZIMMER, M., & HOFMANN, F.** (1987). Differentiation of the drug-binding sites of calmodulin. *Eur J Biochem* **164**, (2), 411–420.

8 Anhang

8.1 Vektorkarten

8.2 Sequenz des Calmodulin (synthetisches Gen mit GGSG-Linker)

Der GGSG-Linker der Sequenzen ist jeweils **gelb** markiert.

8.2.1 Aminosäuresequenz (humanes Calmodulin, nach Genbank ID: ADD45181.1)

SGADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARKMKDSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK**GG**

8.2.2 Nukleotidsequenz (optimiert zur Expression in *E. coli*)

TCCGGTGCAGACCAACTGACGGAAGAACAGATCGCGGAGTTCAAAGAGGCGTTTAGCCTGTTTGA
TAAGGATGGTGACGGTACCATTACCACGAAAGAGCTGGGCACGGTTATGCGCAGCCTGGGCCAGA
ACCCGACCGAGGCGGAGCTGCAGGACATGATTAACGAGGTGGACGCTGACGGTAACGGCACGATC
GATTTCCCGGAATTCTTGACCATGATGGCACGTAAAATGAAGGATACTGACAGCGAAGAAGAAAT
CCGTGAAGCGTTTCGCGTGTTTGACAAAGATGGTAATGGCTACATCTCCGCAGCAGAGCTGCGTC
ACGTTATGACCAATTTGGGTGAGAAGCTGACCGACGAAGAGGTGATGAGATGATTCGTGAGGCC
GACATTGATGGTGATGGCCAAGTCAATTATGAAGAGTTCGTTCAAATGATGACCGCCAAG**GGTGG**
A

8.3 Aminosäuresequenzen ausgewählter permutierter Calmodulin-Varianten

Der GGSG-Linker der Sequenzen ist jeweils **gelb** markiert.

8.3.1 N-perm-1 (3/A)

ADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARKMKDSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK**GGSG**

8.3.2 N-perm-2 (4/D)

DQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARKMKDSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK**GGSGA**

8 ANHANG

8.3.3 M-perm-1 (78/M)

MKDTDSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEE
FVQMMTAKGGSGADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMIN
EVDADGNGTIDFPEFLTMMARK

8.3.4 M-perm-2 (83/S)

SEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMM
TAKGGSGADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDAD
GNGTIDFPEFLTMMARKMKD

8.3.5 C-perm-1 (150/K)

KGGSGADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGN
GTIDFPEFLTMMARKMKDSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMI
READIDGDGQVNYEEFVQMMTA

8.3.6 C-perm-2 (149/A)

AKGGSGADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADG
NGTIDFPEFLTMMARKMKDSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEM
IREADIDGDGQVNYEEFVQMMT

8.4 Oligonukleotide zur Erzeugung permutierter Calmodulin-Varianten

Oligoname	Sequenz (5' → 3')	Oligoname	Sequenz (5' → 3')
Überhang	GGAGGTGCTAGC-	Überhang	CCTCCAGATATC-
perm1/S_fwd	-TCCGGTGCAGACCAACTGAC	perm1/S_rev	-TCCACCCTTGGCGGTCATCA
perm2/G_fwd	-GGTGCAGACCAACTGACGGA	perm2/G_rev	-GGATCCACCCTTGGCGGTCA
perm3/A_fwd	-GCAGACCAACTGACGGAAGA	perm3/A_rev	-ACCGGATCCACCCTTGGCGG
perm4/D_fwd	-GACCAACTGACGGAAGAACA	perm4/D_rev	-TGCACCGGATCCACCCTTGG
perm5/Q_fwd	-CAACTGACGGAAGAACAGAT	perm5/Q_rev	-GTCTGCACCGGATCCACCCT
perm6/L_fwd	-CTGACGGAAGAACAGATCGC	perm6/L_rev	-TTGGTCTGCACCGGATCCAC
perm7/T_fwd	-ACGGAAGAACAGATCGCGGA	perm7/T_rev	-CAGTTGGTCTGCACCGGATC
perm8/E_fwd	-GAAGAACAGATCGCGGAGTT	perm8/E_rev	-CGTCAGTTGGTCTGCACCGG
perm9/E_fwd	-GAACAGATCGCGGAGTTCAA	perm9/E_rev	-TTCCGTCAGTTGGTCTGCAC
perm10/Q_fwd	-CAGATCGCGGAGTTCAAAGA	perm10/Q_rev	-TTCTTCCGTCAGTTGGTCTG
perm11/I_fwd	-ATCGCGGAGTTCAAAGAGGC	perm11/I_rev	-CTGTTCTTCCGTCAGTTGGT
perm12/A_fwd	-GCGGAGTTCAAAGAGGCGTT	perm12/A_rev	-GATCTGTTCTTCCGTCAGTT
perm13/E_fwd	-GAGTTCAAAGAGGCGTTTAG	perm13/E_rev	-CGCGATCTGTTCTTCCGTC
perm14/F_fwd	-TTCAAAGAGGCGTTTAGCCT	perm14/F_rev	-CTCCGCGATCTGTTCTTCCG
perm15/K_fwd	-AAAGAGGCGTTTAGCCTGTT	perm15/K_rev	-GAACTCCGCGATCTGTTCTT
perm16/E_fwd	-GAGGCGTTTAGCCTGTTTGA	perm16/E_rev	-TTTGAATCCGCGATCTGTT
perm17/A_fwd	-GCGTTTAGCCTGTTTGATAA	perm17/A_rev	-CTCTTTGAACTCCGCGATCT
perm18/F_fwd	-TTTAGCCTGTTTGATAAGGA	perm18/F_rev	-CGCCTCTTTGAACTCCGCGA
perm19/S_fwd	-AGCCTGTTTGATAAGGATGG	perm19/S_rev	-AAACGCCTCTTTGAACTCCG
perm20/L_fwd	-CTGTTTGATAAGGATGGTGA	perm20/L_rev	-GCTAAACGCCTCTTTGAACT
perm21/F_fwd	-TTTGATAAGGATGGTGACGG	perm21/F_rev	-CAGGCTAAACGCCTCTTTGA
perm22/D_fwd	-GATAAGGATGGTGACGGTAC	perm22/D_rev	-AAACAGGCTAAACGCCTCTT
perm23/K_fwd	-AAGGATGGTGACGGTACCAT	perm23/K_rev	-ATCAAACAGGCTAAACGCCT
perm24/D_fwd	-GATGGTGACGGTACCATAC	perm24/D_rev	-CTTATCAAACAGGCTAAACG
perm25/G_fwd	-GGTGACGGTACCATACAC	perm25/G_rev	-ATCCTTATCAAACAGGCTAA
perm26/D_fwd	-GACGGTACCATACACGAA	perm26/D_rev	-ACCATCCTTATCAAACAGGC
perm27/G_fwd	-GGTACCATACACGAAAGA	perm27/G_rev	-GTCACCATCCTTATCAAACA
perm28/T_fwd	-ACCATACACGAAAGAGCT	perm28/T_rev	-ACCGTCACCATCCTTATCAA

8 ANHANG

Oligoname	Sequenz (5'→ 3')	Oligoname	Sequenz (5'→ 3')
Überhang	GGAGGTGCTAGC-	Überhang	CCTCCAGATATC-
perm29/L_fwd	-ATTACCACGAAAGAGCTGGG	perm29/L_rev	-GGTACCGTCACCATCCTTAT
perm30/T_fwd	-ACCACGAAAGAGCTGGGCAC	perm30/T_rev	-AATGGTACCGTCACCATCCT
perm31/T_fwd	-ACGAAAGAGCTGGGCACGGT	perm31/T_rev	-GGTAATGGTACCGTCACCAT
perm32/K_fwd	-AAAGAGCTGGGCACGGTTAT	perm32/K_rev	-CGTGGTAATGGTACCGTCAC
perm33/E_fwd	-GAGCTGGGCACGGTTATGCG	perm33/E_rev	-TTTCGTTGGTAATGGTACCGT
perm34/L_fwd	-CTGGGCACGGTTATGCGCAG	perm34/L_rev	-CTCTTTCGTGGTAATGGTAC
perm35/G_fwd	-GGCACGGTTATGCGCAGCCT	perm35/G_rev	-CAGCTCTTTCGTGGTAATGG
perm36/T_fwd	-ACGGTTATGCGCAGCCTGGG	perm36/T_rev	-GCCCAGCTCTTTCGTGGTAA
perm37/V_fwd	-GTTATGCGCAGCCTGGGCCA	perm37/V_rev	-CGTGCCAGCTCTTTCGTGG
perm38/M_fwd	-ATGCGCAGCCTGGGCCAGAA	perm38/M_rev	-AACCCTGCCCAGCTCTTTCG
perm39/R_fwd	-CGCAGCCTGGGCCAGAACCC	perm39/R_rev	-CATAACCGTGCCCAGCTCTT
perm40/S_fwd	-AGCCTGGGCCAGAACCCGAC	perm40/S_rev	-GCGCATAACCGTGCCCAGCT
perm41/L_fwd	-CTGGGCCAGAACCCGACCGA	perm41/L_rev	-GCTGCGCATAACCGTGCCCA
perm42/G_fwd	-GGCCAGAACCCGACCGAGGC	perm42/G_rev	-CAGGCTGCGCATAACCGTGC
perm43/Q_fwd	-CAGAACCCGACCGAGGCGGA	perm43/Q_rev	-GCCCAGGCTGCGCATAACCG
perm44/N_fwd	-AACCCGACCGAGGCGGAGCT	perm44/N_rev	-CTGGCCAGGCTGCGCATAA
perm45/P_fwd	-CCGACCGAGGCGGAGCTGCA	perm45/P_rev	-GTTCTGGCCAGGCTGCGCA
perm46/T_fwd	-ACCGAGGCGGAGCTGCAGGA	perm46/T_rev	-CGGGTCTGGCCAGGCTGC
perm47/E_fwd	-GAGGCGGAGCTGCAGGACAT	perm47/E_rev	-GGTCGGGTCTGGCCAGGCG
perm48/A_fwd	-GCGGAGCTGCAGGACATGAT	perm48/A_rev	-CTCGGTGCGGTCTTGCCCCA
perm49/E_fwd	-GAGCTGCAGGACATGATTAA	perm49/E_rev	-CGCCTCGGTGCGGTCTTGCC
perm50/L_fwd	-CTGCAGGACATGATTAAACGA	perm50/L_rev	-CTCCGCTCGGTGCGGTCTCT
perm51/Q_fwd	-CAGGACATGATTAAACGAGGT	perm51/Q_rev	-CAGCTCCGCTCGGTGCGGT
perm52/D_fwd	-GACATGATTAAACGAGGTGGA	perm52/D_rev	-CTGCAGCTCCGCTCGGTGCG
perm53/M_fwd	-ATGATTAAACGAGGTGGACGC	perm53/M_rev	-GTCCTGCAGCTCCGCTCGG
perm54/I_fwd	-ATTAACGAGGTGGACGCTGA	perm54/I_rev	-CATGTCTGCAGCTCCGCT
perm55/N_fwd	-AACGAGGTGGACGCTGACGG	perm55/N_rev	-AATCATGTCTGCAGCTCCG
perm56/E_fwd	-GAGGTGGACGCTGACGGTAA	perm56/E_rev	-GTTAATCATGTCTGCAGCT
perm57/V_fwd	-GTGGACGCTGACGGTAACGG	perm57/V_rev	-CTCGTTAATCATGTCTGCA
perm58/D_fwd	-GACGCTGACGGTAACGGCAC	perm58/D_rev	-CACCTCGTTAATCATGTCTCT
perm59/A_fwd	-GCTGACGGTAACGGCACGAT	perm59/A_rev	-GTCCACCTCGTTAATCATGT
perm60/D_fwd	-GACGGTAACGGCACGATCGA	perm60/D_rev	-AGCGTCCACCTCGTTAATCA
perm61/G_fwd	-GGTAACGGCACGATCGATTT	perm61/G_rev	-GTCAGCGTCCACCTCGTTAA
perm62/N_fwd	-AACGGCACGATCGATTTCCC	perm62/N_rev	-ACCGTCAGCGTCCACCTCGT
perm63/G_fwd	-GGCACGATCGATTTCCCGGA	perm63/G_rev	-GTTACCGTCAGCGTCCACCT
perm64/T_fwd	-ACGATCGATTTCCCGGAATT	perm64/T_rev	-GCCGTTACCGTCAGCGTCCA
perm65/I_fwd	-ATCGATTTCCCGGAATTCTT	perm65/I_rev	-CGTCTCGTTACCGTCAGCGT
perm66/D_fwd	-GATTTCCCGGAATTCTTGAC	perm66/D_rev	-GATCGTGCCGTTACCGTCAG
perm67/F_fwd	-TTCCCGGAATTCTTGACCAT	perm67/F_rev	-ATCGATCGTGCCGTTACCGT
perm68/P_fwd	-CCGGAATTCTTGACCATGAT	perm68/P_rev	-GAAATCGATCGTGCCGTTAC
perm69/E_fwd	-GAATTCTTGACCATGATGGC	perm69/E_rev	-CGGGAATCGATCGTGCCGT
perm70/F_fwd	-TTCTTGACCATGATGGCACG	perm70/F_rev	-TTCCGGGAAATCGATCGTGC
perm71/L_fwd	-TTGACCATGATGGCACGTAA	perm71/L_rev	-GAATTCGGGAAATCGATCG
perm72/T_fwd	-ACCATGATGGCACGTAAAT	perm72/T_rev	-CAAGAATTCCGGGAAATCGA
perm73/M_fwd	-ATGATGGCACGTAAATGA	perm73/M_rev	-GGTCAAGAATTCCGGGAAAT
perm74/M_fwd	-ATGGCACGTAAATGAAGGA	perm74/M_rev	-CATGGTCAAGAATTCGGGA
perm75/A_fwd	-GCACGTAAATGAAGGATAC	perm75/A_rev	-CATCATGGTCAAGAATTCGG
perm76/R_fwd	-CGTAAATGAAGGATACTGA	perm76/R_rev	-TGCCATCATGGTCAAGAATT
perm77/K_fwd	-AAAATGAAGGATACTGACAG	perm77/K_rev	-ACGTGCCATCATGGTCAAGA
perm78/M_fwd	-ATGAAGGATACTGACAGCGA	perm78/M_rev	-TTTACGTGCCATCATGGTCA
perm79/K_fwd	-AAGGATACTGACAGCGAAGA	perm79/K_rev	-CATTTTACGTGCCATCATGG
perm80/D_fwd	-GATACTGACAGCGAAGAAGA	perm80/D_rev	-CTTCATTTTACGTGCCATCA
perm81/T_fwd	-ACTGACAGCGAAGAAGAAAT	perm81/T_rev	-ATCCTTCATTTTACGTGCCA
perm82/D_fwd	-GACAGCGAAGAAGAAATCCG	perm82/D_rev	-AGTATCCTTCATTTTACGTG
perm83/S_fwd	-AGCGAAGAAGAAATCCGTGA	perm83/S_rev	-GTCAGTATCCTTCATTTTAC
perm84/E_fwd	-GAAGAAGAAATCCGTGAAGC	perm84/E_rev	-GCTGTGAGTATCCTTCATTT
perm85/E_fwd	-GAAGAAATCCGTGAAGCGTT	perm85/E_rev	-TTCGCTGTGAGTATCCTTCA
perm86/E_fwd	-GAAATCCGTGAAGCGTTTCG	perm86/E_rev	-TTCTTCGTGTGAGTATCCT
perm87/I_fwd	-ATCCGTGAAGCGTTTCGCGT	perm87/I_rev	-TTCTTCTTCGTGTGAGTAT
perm88/R_fwd	-CGTGAAGCGTTTCGCGTGTT	perm88/R_rev	-GATTTCTTCTTCGTGTGAG
perm89/E_fwd	-GAAGCGTTTCGCGTGTTTGA	perm89/E_rev	-ACGGATTTCTTCTTCGTGT
perm90/A_fwd	-GCGTTTCGCGTGTTTGACAA	perm90/A_rev	-TTCACGGATTTCTTCTTCGC
perm91/F_fwd	-TTTCGCGTGTTTGACAAAGA	perm91/F_rev	-CGCTTCACGGATTTCTTCTT
perm92/R_fwd	-CGCGTGTTTGACAAAGATGG	perm92/R_rev	-AAACGCTTCACGGATTTCTT

8 ANHANG

Oligoname	Sequenz (5'→ 3')	Oligoname	Sequenz (5'→ 3')
Überhang	GGAGGTGCTAGC-	Überhang	CCTCCAGATATC-
perm93/V_fwd	-GTGTTTGACAAAGATGGTAA	perm93/V_rev	-GCGAAACGCTTCACGGATTT
perm94/F_fwd	-TTTGACAAAGATGGTAATGG	perm94/F_rev	-CACGCGAAACGCTTCACGGA
perm95/D_fwd	-GACAAAGATGGTAATGGCTA	perm95/D_rev	-AAACACGCGAAACGCTTCAC
perm96/K_fwd	-AAAGATGGTAATGGCTACAT	perm96/K_rev	-GTCAAACACGCGAAACGCTT
perm97/D_fwd	-GATGGTAATGGCTACATCTC	perm97/D_rev	-TTTGTCAAACACGCGAAACG
perm98/G_fwd	-GGTAATGGCTACATCTCCGC	perm98/G_rev	-ATCTTTGTCAAACACGCGAA
perm99/N_fwd	-AATGGCTACATCTCCGCAGC	perm99/N_rev	-ACCATCTTTGTCAAACACGC
perm100/G_fwd	-GGCTACATCTCCGCAGCAGA	perm100/G_rev	-ATTACCATCTTTGTCAAACA
perm101/Y_fwd	-TACATCTCCGCAGCAGAGCT	perm101/Y_rev	-GCCATTACCATCTTTGTCAA
perm102/I_fwd	-ATCTCCGCAGCAGAGCTGCG	perm102/I_rev	-GTAGCCATTACCATCTTTGT
perm103/S_fwd	-TCCGCAGCAGAGCTGCGTCA	perm103/S_rev	-GATGTAGCCATTACCATCTT
perm104/A_fwd	-GCAGCAGAGCTGCGTCACGT	perm104/A_rev	-GGAGATGTAGCCATTACCAT
perm105/A_fwd	-GCAGAGCTGCGTCACGTTAT	perm105/A_rev	-TGCGGAGATGTAGCCATTAC
perm106/E_fwd	-GAGCTGCGTCACGTTATGAC	perm106/E_rev	-TGCTGCGGAGATGTAGCCAT
perm107/L_fwd	-CTGCGTCACGTTATGACCA	perm107/L_rev	-CTCTGCTGCGGAGATGTAGC
perm108/R_fwd	-CGTCACGTTATGACCAATTT	perm108/R_rev	-CAGCTCTGCTGCGGAGATGT
perm109/H_fwd	-CACGTTATGACCAATTTGGG	perm109/H_rev	-ACGCAGCTCTGCTGCGGAGA
perm110/V_fwd	-GTTATGACCAATTTGGGTGA	perm110/V_rev	-GTGACGCAGCTCTGCTGCGG
perm111/M_fwd	-ATGACCAATTTGGGTGAGAA	perm111/M_rev	-AACGTGACGCAGCTCTGCTG
perm112/T_fwd	-ACCAATTTGGGTGAGAAGCT	perm112/T_rev	-CATAACGTGACGCAGCTCTG
perm113/N_fwd	-AATTTGGGTGAGAAGCTGAC	perm113/N_rev	-GGTCATAACGTGACGCAGCT
perm114/L_fwd	-TTGGGTGAGAAGCTGACCGA	perm114/L_rev	-ATTGGTCATAACGTGACGCA
perm115/G_fwd	-GGTGAGAAGCTGACCGACGA	perm115/G_rev	-CAAATTTGGTCATAACGTGAC
perm116/E_fwd	-GAGAAGCTGACCGACGAAGA	perm116/E_rev	-ACCCAAATTGGTCATAACGT
perm117/K_fwd	-AAGCTGACCGACGAAGAGGT	perm117/K_rev	-CTCACCCAAATTGGTCATAA
perm118/L_fwd	-CTGACCGACGAAGAGGTGCA	perm118/L_rev	-CTTCTCACCCAAATTGGTCA
perm119/T_fwd	-ACCGACGAAGAGGTGCGATGA	perm119/T_rev	-CAGCTTCTCACCCAAATTGG
perm120/D_fwd	-GACGAAGAGGTGCGATGAGAT	perm120/D_rev	-GGTCAGCTTCTCACCCAAAT
perm121/E_fwd	-GAAGAGGTGCGATGAGATGAT	perm121/E_rev	-GTCGGTCAGCTTCTCACCCA
perm122/E_fwd	-GAGGTGCGATGAGATGATTG	perm122/E_rev	-TTCGTGCGGTGAGCTTCTCAC
perm123/V_fwd	-GTCGATGAGATGATTCGTGA	perm123/V_rev	-CTCTTCGTGCGGTGAGCTTCT
perm124/D_fwd	-GATGAGATGATTCGTGAGGC	perm124/D_rev	-GACCTCTTCGTGCGGTGAGCT
perm125/E_fwd	-GAGATGATTCGTGAGGCCGA	perm125/E_rev	-ATCGACCTCTTCGTGCGTCA
perm126/M_fwd	-ATGATTCGTGAGGCCGACAT	perm126/M_rev	-CTCATCGACCTCTTCGTGCG
perm127/I_fwd	-ATTCTGTGAGGCCGACATTGA	perm127/I_rev	-CATCTCATCGACCTCTTCGT
perm128/R_fwd	-CGTGAGGCCGACATTGATGG	perm128/R_rev	-AATCATCTCATCGACCTCTT
perm129/E_fwd	-GAGGCCGACATTGATGGTGA	perm129/E_rev	-ACGAATCATCTCATCGACCT
perm130/A_fwd	-GCCGACATTGATGGTGATGG	perm130/A_rev	-CTCACGAATCATCTCATCGA
perm131/D_fwd	-GACATTGATGGTGATGGCCA	perm131/D_rev	-GGCCTCACGAATCATCTCAT
perm132/I_fwd	-ATTGATGGTGATGGCCAAGT	perm132/I_rev	-GTCGGCCTCACGAATCATCT
perm133/D_fwd	-GATGGTGATGGCCAAGTCAA	perm133/D_rev	-AATGTGCGCCTCACGAATCA
perm134/G_fwd	-GGTGATGGCCAAGTCAATTA	perm134/G_rev	-ATCAATGTGCGCCTCACGAA
perm135/D_fwd	-GATGGCCAAGTCAATTATGA	perm135/D_rev	-ACCATCAATGTGCGCCTCAC
perm136/G_fwd	-GGCCAAGTCAATTATGAAGA	perm136/G_rev	-ATCACCATCAATGTGCGCCT
perm137/Q_fwd	-CAAGTCAATTATGAAGAGTT	perm137/Q_rev	-GCCATCACCATCAATGTGCG
perm138/V_fwd	-GTCAATTATGAAGAGTTCGT	perm138/V_rev	-TTGGCCATCACCATCAATGT
perm139/N_fwd	-AATTATGAAGAGTTCGTTCA	perm139/N_rev	-GACTTGGCCATCACCATCAA
perm140/Y_fwd	-TATGAAGAGTTCGTTCAAAT	perm140/Y_rev	-ATTGACTTGGCCATCACCAT
perm141/E_fwd	-GAAGAGTTCGTTCAAATGAT	perm141/E_rev	-ATAATTGACTTGGCCATCAC
perm142/E_fwd	-GAGTTCGTTCAAATGATGAC	perm142/E_rev	-TTCATAATTGACTTGGCCAT
perm143/F_fwd	-TTCGTTCAAATGATGACCGC	perm143/F_rev	-CTCTTCATAATTGACTTGGC
perm144/V_fwd	-GTTCAAATGATGACCGCCAA	perm144/V_rev	-GAACTCTTCATAATTGACTT
perm145/Q_fwd	-CAAATGATGACCGCCAAGGG	perm145/Q_rev	-AACGAACTCTTCATAATTGA
perm146/M_fwd	-ATGATGACCGCCAAGGGTGG	perm146/M_rev	-TTGAACGAACTCTTCATAAT
perm147/M_fwd	-ATGACCGCCAAGGGTGGATC	perm147/M_rev	-CATTTGAACGAACTCTTCAT
perm148/T_fwd	-ACCGCCAAGGGTGGATCCGG	perm148/T_rev	-CATCATTTGAACGAACTCTT
perm149/A_fwd	-GCCAAGGGTGGATCCGGTGC	perm149/A_rev	-GGTCATCATTTGAACGAACT
perm150/K_fwd	-AAGGGTGGATCCGGTGCAGA	perm150/K_rev	-GGCGGTGATCATTTGAACGA
perm151/G_fwd	-GGTGGATCCGGTGCAGACCA	perm151/G_rev	-CTTGCGGTGATCATTTGAA
perm152/G_fwd	-GGATCCGGTGCAGACCAACT	perm152/G_rev	-ACCCCTTGCGGTGATCATTTT

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe „Rekombinante Proteine“ der Forschungsabteilung der Miltenyi Biotec GmbH angefertigt. Zu Beginn möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Holger Thie für die Betreuung und Initiierung des Projektes bedanken und seiner Bereitschaft, jederzeit ein offenes Ohr für meine projektbezogenen „Freuden und Leiden“ zu haben. Außerdem danke ich der Miltenyi Biotec GmbH für die Möglichkeit, meine Arbeit im Unternehmen durchführen zu können.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel für die universitäre Betreuung und Initiierung des Projektes bedanken. Ohne ihn wäre die Arbeit in dieser Form nicht zustande gekommen. Auch möchte ich mich für seinen Enthusiasmus, die stete Hilfsbereitschaft und die zahlreichen Ideen bedanken, die zum Erfolg des Projektes beigetragen haben.

Ferner möchte ich mich bei Herrn apl. Prof. Dr. Michael Hust und Herrn Prof. Dr. Roland Kontermann für die freundliche Übernahme des Zweit- bzw. Drittgutachtens bedanken. Außerdem geht mein Dank an apl. Prof. Dr. Reinhard Hehl für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Auch bei Frau Dagmar Häußler (PhD) und Herrn Dr. Volker Nölle möchte ich mich ganz herzlich für die Betreuung der Arbeit und die Korrektur des Manuskripts bedanken.

Ein großer Dank geht an meine zahlreichen Kollegen bei der Miltenyi Biotec GmbH, die mich auf unterschiedlichste Weise im Laufe dieser Arbeit unterstützt haben. Zum einen danke ich Torsten Schardt und Anna Bergmann für ihre exzellente Unterstützung bei den SEC-basierten Versuchen. Bei den „Rekombinanten Proteinen“ möchte ich mich für die stete Hilfsbereitschaft bedanken. Auch meinen Bürokollegen danke ich für die zahlreichen Diskussionen jeglicher Art und den Spaß, den man mit ihnen haben konnte. Ferner geht ein besonderer Dank an Pia Rakoczy und Sarah Schmitz für die Korrektur des Manuskripts.

Ein weiterer Dank geht an den Lehrer meines Biologie-Leistungskurses, Stephan Katirtzis, dessen fantastischer Unterricht mein Interesse für die Biologie erst richtig geweckt hat.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, im Besonderen bei meinen Eltern und meinem Ehemann, bedanken. Ohne Eure Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Lebenslauf

Name Sarah-Jane Kellmann
Geburtsdatum 30.06.1988
Geburtsort Berlin
Familienstand verheiratet

Wissenschaftlicher Werdegang

- 01/2013-03/2017 **Promotion bei der Miltenyi Biotec GmbH**
R&D Reagents, Arbeitsgruppe Rekombinante Proteine, Bergisch Gladbach;
betreut durch Prof. Dr. Stefan Dübel, Institut für Biochemie,
Biotechnologie und Bioinformatik, Technische Universität Braunschweig;
Thema der Arbeit: „Generierung schaltbarer Antikörperfragmente“
- 11/2011-08/2012 **Masterarbeit bei der Miltenyi Biotec GmbH**
R&D Reagents, Arbeitsgruppe Rekombinante Proteine, Bergisch Gladbach;
betreut durch Prof. Dr. Danja Schünemann, Lehrstuhl für
Pflanzenphysiologie, Ruhr-Universität Bochum; Thema der Arbeit:
„Erzeugung von *Escherichia coli*-Mutanten zur sekretorischen Produktion
von rekombinanten Antikörperfragmenten“
- 04/2011-06/2011 **Praktikum bei der Miltenyi Biotec GmbH**
R&D Reagents, Arbeitsgruppe Stammzellen, Bergisch Gladbach
- 03/2010-08/2010 **Bachelorarbeit**
Betreut durch apl. Prof. Dr. Christiane Dahl, Institut für Mikrobiologie und
Biotechnologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn; Thema
der Arbeit: „Untersuchung potentiell wichtiger Strukturen, die bei der
Aufnahme von elementarem Schwefel in *Allochromatium vinosum* eine
Rolle spielen“

Ausbildung

- 01/2013-03/2017 **Promotionsstudium, Biotechnologie**
Technische Universität Braunschweig
- 10/2010-09/2012 **Master of Science, Biologie**
Ruhr-Universität Bochum
Abschlussnote: Sehr gut (1,2)
- 10/2007-09/2010 **Bachelor of Science, Biologie**
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Abschlussnote: Sehr gut (1,3)
- 06/2007 **Erlangung der allgemeinen Hochschulreife (Abitur)**
Gymnasium Herkenrath
Abschlussnote: Sehr gut (1,4)

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Publikation:

Kellmann, S., Dübel, S., Thie, H. (2017). A strategy to identify linker-based modules for the allosteric regulation of antibody-antigen binding affinities of different scFvs. *mAbs* 9 (3), 404-418.

Patent:

Kellmann, S., Dübel, S., Thie, H. (2016). Composition and method for affecting the binding of antigen-binding polypeptides to antigens (EP16181971.9).